



HAL
open science

Développement d'un modèle mathématique pour la détermination de la numération réticulocytaire chez le chat anémié par l'automate d'hématologie Sysmex XT-2000

Barnabé Courzereaux

► **To cite this version:**

Barnabé Courzereaux. Développement d'un modèle mathématique pour la détermination de la numération réticulocytaire chez le chat anémié par l'automate d'hématologie Sysmex XT-2000. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04300947

HAL Id: dumas-04300947

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04300947v1>

Submitted on 22 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2023

**DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE MATHÉMATIQUE POUR
LA DÉTERMINATION DE LA NUMÉRATION
RÉTICULOCYTAIRE CHEZ LE CHAT ANÉMIÉ PAR
L'AUTOMATE D'HÉMATOLOGIE SYSMEX XT-2000**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 6 octobre 2023

par

Barnabé, Patrick, Jean COURZEREUX

sous la direction de

Pierre Deshuillers

JURY

Président du jury :	M. Loïc Desquilbet	Professeur à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Pierre Deshuillers	Maître de Conférences à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Christelle Maurey-Guéneç	Professeur à l'EnvA
Membre invité	Mme Amélie Fau	Maître de Conférences à l'ENS Paris-Saclay

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version juillet 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtinet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérandère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

A M. Pierre Deshuillers, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour avoir été mon directeur de thèse depuis bientôt deux ans et demi. Merci encore pour votre patience, votre disponibilité, vos conseils et pour m'avoir épaulé dans ce travail. C'est grâce à vous que j'ai compris le sens du mot précision, mes très sincères remerciements.

A Mme Amélie Fau, Maître de Conférences à l'ENS Paris-Saclay,

Pour avoir supervisé ce travail et avoir accepté de m'aider, malgré le fait que les réticulocytes soient très éloignés de la mécanique. Merci pour ces conseils, cette rigueur et cet œil extérieur qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit. J'espère que cette collaboration vous a plu et vous a donné envie d'aider d'autres vétérinaires. Mes plus sincères remerciements.

Au Président du Jury de cette thèse, M. Loïc Desquilbet , Professeur à l'EnvA,

Pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et pour avoir été un tuteur toujours à l'écoute au cours de ma scolarité, mes plus sincères remerciements.

A Mme Christelle Maurey-Guénec, Professeur à l'EnvA,

Pour me faire l'honneur d'être l'examinatrice de cette thèse, et pour les enseignements que j'ai eu de votre part en clinique, mes plus sincères remerciements.

A M. Jean-Luc Servely, Chercheur à l'INRA

Pour votre encadrement dans mes manipulations et pour votre disponibilité, merci beaucoup.

A ma famille et mes amis,

Pour m'avoir épaulé au cours de ces longues années d'études et d'avoir toujours cru en moi. Merci infiniment.

Table des matières

Liste des Figures.....	3
Liste des Tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Première partie :	11
1. Importance biologique du réticulocyte.....	11
a. Place du réticulocyte au sein de l'érythropoïèse.....	11
b. L'anémie : signes cliniques et diagnostic.....	11
c. Réticulocytes et anémie.....	12
2. Le comptage manuel.....	13
3. Le comptage automatique par cytométrie de flux et fluorescence optique.....	15
a. Principe.....	15
b. Le IDEXX Procyte DX.....	18
c. Le SYSMEX XT-2000.....	20
4. Sources d'erreurs de ces méthodes de mesures.....	21
a. Corps de Howell-Jolly.....	21
b. Corps de Heinz.....	22
c. Inclusions basophiles.....	22
d. Infection à Mycoplasma.....	23
e. Autres cellules présentes dans l'échantillon.....	23
5. Bilan.....	24
6. Intérêt de notre étude.....	25
Deuxième partie : étude expérimentale	27
1. Introduction.....	27
2. Matériels et méthodes.....	27
a. Sélection des cas.....	27
b. Critères d'exclusions.....	27
c. Méthode manuelle.....	27
d. Objectif 1 : Objectiver et quantifier le biais du SYSMEX XT-2000.....	29
a. IDEXX Procyte Dx.....	29
b. SYSMEX XT-2000.....	29
c. Extraction des données des automates.....	29
d. Calcul des coefficients de variabilité.....	29
e. Coefficient de concordance de Lin.....	29
f. Graphique de Bland et Altman (Bland et Altman, 1986).....	30
g. Validation d'une méthode selon l'ASVCP.....	31
e. Objectif 2 : détermination du modèle mathématique.....	31
a. Constitution de sous-groupes d'individus.....	31
b. Régression linéaire multiple.....	32
c. Conditions à imposer concernant l'équation.....	32
d. Outils statistiques.....	32
3. Résultats.....	32
a. Caractérisation de l'échantillon et des sous-groupes.....	32
b. Objectif 1.....	35
a. Coefficient de concordance de Lin concernant les différentes variables.....	35
b. Quantification du biais sur la mesure du nombre absolu de réticulocytes.....	35
c. Quantification du biais sur la mesure du pourcentage de réticulocytes.....	36
d. Quantification du biais sur la mesure du pourcentage LFR relatif, MFR relatif et HFR relatif.....	38

e. Calcul des Coefficients de variabilités et des Total error observed (TEo)	40
f. Conclusions sur les premiers résultats	41
c. <i>Objectif 2</i>	42
a. Obtention du modèle	42
b. Coefficients de Lin pour les différentes variables du modèle	42
c. Concordance du modèle avec la méthode manuelle	43
d. <i>TEo du modèle</i>	45
4. Analyse des résultats	46
a. <i>Analyse du modèle</i>	46
<i>Afin d'explorer les domaines de définition où le modèle donne des résultats ne respectant pas les conditions de sortie de l'équation, le modèle est analysé au niveau de ces termes et les variations du modèle sont étudiées.</i>	46
• Coefficients de Lin pour les différentes variables du modèle ajusté	52
b. <i>Individus donnant des résultats rejetés</i>	55
c. <i>Bilan</i>	56
5. Discussion	57
a. <i>Critères d'inclusion/exclusion</i>	57
b. <i>Méthode manuelle et choix du nombre de ponctuations</i>	57
c. <i>Validité statistique des recommandations de l'ASVCP</i>	58
d. <i>Application du modèle pour le classement des anémies régénératives</i>	58
e. <i>Obsolescence du SYSMEX XT-2000</i>	59
Conclusion	61
Liste des références bibliographiques	63
Annexe 1 : Description de l'échantillon et des sous-groupes	67
Annexe 2 : Explication d'un modèle multivaré, d'après (Yergeau et Poirier, 2023)	71
Annexe 3 : Utilisation de XLSTAT, d'après (ADDINSOFT, 2023)	73

Liste des Figures

Figure 1 - Champ d'un frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant (x1000)	14
Figure 2 - Schéma d'une buse de focalisation (Crédit : Mayol et al., 2020).....	16
Figure 3 - Exemple de nuage de points donnés par l'IDEXX Procyte Dx(d'après (« Interprétation des nuages de points de l'analyseur d'hématologie ProCyte Dx d'IDEXX », s. d.))	17
Figure 4 - Automate de comptage IDEXX Procyte DX (Crédit : Idexx).....	18
Figure 5 - Automate de comptage SYSMEX XT-2000 (Crédit : SYSMEX).....	20
Figure 6 - Corps Howell Jolly un frottis sanguin à la coloration Bleu de Crésyl (x1000)	21
Figure 7 - Corps de Heinz sur un frottis sanguin à la coloration Bleu de Crésyl (x1000)	22
Figure 8 - Inclusions basophiles sur des frottis sanguins colorés à la coloration may-grunwald-giemsa (MGG) (x1000).....	22
Figure 9 - Hématies présentant des infections à mycoplasme, frottis sanguin coloré à la coloration MGG (x1000)	23
Figure 10 - Partie d'une mosaïque d'image de frottis sanguin de chat anémié coloré au bleu de crésyl brillant (x1000)	28
Figure 11 - Exemple d'un comptage manuel avec CellCounter, plugin d'ImageJ (Légende : type 1 = réticulocyte agrégé, type 2 = réticulocyte ponctué, type 3 = hématie).....	28
Figure 12 - Graphique de Bland et Altman entre la numération réticulocytaire absolue obtenue par le IDEXX Procyte DX et par le SYSMEX XT-2000.....	36
Figure 13 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de réticulocytes obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000.....	37
Figure 14 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de LFR obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000.....	39
Figure 15 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de MFR obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000.....	39
Figure 16 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de HFR obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000.....	40
Figure 17 - Graphique de Bland et Altman entre le taux en réticulocytes agrégés obtenu par le comptage manuel et par le modèle mathématique	44
Figure 18 - Graphique de Bland et Altman entre le taux en réticulocytes ponctué obtenu par le comptage manuel et par le modèle mathématique	44

Figure 19 - Graphique de Bland et Altman entre le taux en réticulocytes total obtenu par le comptage manuel et par le modèle mathématique.....	45
Figure 20 - Pourcentage d'agrégés en fonction du taux de LFR à taux de MFR et taux de HFR fixe	48
Figure 21 - Pourcentage d'agrégés en fonction du taux de MFR à taux de LFR et taux de HFR fixe	48
Figure 22 - Pourcentage d'agrégés en fonction du taux de HFR à taux de LFR et taux de MFR fixe	48
Figure 23 - Pourcentage de ponctués en fonction du taux de LFR à taux de MFR et taux de HFR fixe	49
Figure 24 - Pourcentage de ponctués en fonction du taux de MFR à taux de LFR et taux de HFR fixe	49
Figure 25 - Pourcentage de ponctués en fonction du taux de HFR à taux de LFR et taux de MFR fixe	49
Figure 26 - Graphique de Bland et Altman entre le taux d'agrégés obtenu par l'équation et le taux d'agrégés obtenu par comptage manuel	51
Figure 27 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de réticulocytes total obtenu par l'équation et le taux de réticulocytes total obtenu par comptage manuel	51
Figure 28 - Taux de ponctués obtenu par l'équation en fonction du taux de LFR et du taux de HFR	56
Figure 29 - Diagramme circulaire montrant la répartition des sexes au sein de l'échantillon (n=100)	67
Figure 30 - Histogramme montrant la répartition des âges au sein de l'échantillon (n=100)	68
Figure 31 - Diagramme circulaire montrant la répartition des races au sein de l'échantillon (n=100)	68
Figure 32 - Diagramme circulaire montrant la répartition des sexes au sein du sous-groupe 1 (n=50)	69
Figure 33 - Diagramme circulaire montrant la répartition des sexes dans le sous-groupe 2 (n=50)	69
Figure 34 - Histogramme montrant la répartition de l'âge au sein du sous-groupe 1 (n=50)	69
Figure 35 - Histogramme montrant la répartition de l'âge au sein du sous-groupe 2 (n=50)	69
Figure 36 - Diagramme circulaire montrant la répartition des races dans le sous-groupe 1 (n=50)	70
Figure 37 - Diagramme circulaire montrant la répartition des races dans le sous-groupe 2 (n=50)	70

Liste des Tableaux

Tableau 1 - Classification de la sévérité des anémies en fonction de l'hématocrite chez le chat (d'après (Weiss, 2022))	12
Tableau 2 - Classification des anémies en fonction des taux de réticulocytes (d'après Cowgill et al., 2003).....	13
Tableau 3 - Variables données par le IDEXX Procyte Dx concernant les réticulocytes (d'après C. Boudu, 2020).....	19
Tableau 4 - D'après Weissenbacher, coefficients de variabilités des variables données par le SYSMEX XT-2000.....	21
Tableau 5 - Récapitulatif des propriétés des différents instruments et méthodes de mesure des réticulocytes	24
Tableau 6 - Interprétation du coefficient de concordance de Lin (d'après (Landis et Koch, 1977)).	30
Tableau 7 - Critère de Bland et Altman de notre étude	30
Tableau 8 - Comparaison des sous-groupes 1 et 2 (n=50) sur leur numération réticulocytaires selon les différentes méthodes utilisées.....	34
Tableau 9 - Coefficient de concordance de Lin entre les différentes variables des automates	35
Tableau 10 - Comptage absolu de réticulocytes donné par le SYSMEX XT-2000 en fonction de celui donné par le IDEXX Procyte Dx	36
Tableau 11 - Coefficients de variabilité en fonction du type de réticulocytes et du taux de réticulocytes par l'automate SYSMEX XT-2000	40
Tableau 12 - Biais en fonction des variables données par le SYSMEX XT-2000	40
Tableau 13 - TEobs en fonction du type de réticulocytes et du taux de réticulocytes par l'automate SYSMEX XT-2000.....	41
Tableau 14 - Coefficient de concordance de Lin entre les différentes variables des automates.....	43
Tableau 14 - Biais en fonction des variables données par le modèle mathématique	45
Tableau 15- Coefficient de variation du modèle en fonction du taux de réticulocytes	45
Tableau 16 - TEo des variables données par le modèle	46
Tableau 17 - Médiane des pourcentages obtenus avec l'automate SYSMEX XT-2000 du sous-groupe 1	46
Tableau 19 - Coefficient de concordance de Lin entre les différentes variables des automates.....	52
Tableau 20 - Biais en fonction des variables données par le modèle mathématique ajusté	52

Tableau 21- Coefficient de variabilité du modèle mathématique ajusté en fonction du taux de réticulocytes	52
Tableau 22 - TEO des variables données par le modèle mathématique ajusté	53
Tableau 23 - Pourcentage de réticulocytes agrégés donné par le modèle mathématique en fonction de celui donné par le comptage manuel	53
Tableau 24 - Classification de l'anémie obtenue par le modèle mathématique en fonction du taux de réticulocytes agrégés donné par l'équation.....	54
Tableau 25 - Pourcentage de réticulocytes ponctués donné par l'équation en fonction de celui donné par le comptage manuel	54
Tableau 26 - Classification de l'anémie obtenue par l'équation en fonction du taux de réticulocytes ponctués donné par l'équation.....	54
Tableau 25 - Coefficient de variabilité en fonction du type de réticulocytes et du taux de réticulocytes par la méthode de comptage manuel	58

Liste des abréviations

HFR : High fluorescence reticulocytes

MFR : Medium fluorescence reticulocytes

LFR : Low fluorescence reticulocytes

%HFR : Pourcentage de High Fluorescence reticulocytes

%MFR : Pourcentage de Medium Fluorescence reticulocytes

%LFR : Pourcentage de Low Fluorescence reticulocytes

%Réticulocytes : Pourcentage de réticulocytes dans l'échantillon

TEo : Total error observed

Introduction

La numération réticulocytaire chez le chat est un outil précieux en médecine vétérinaire, permettant aux cliniciens de classer les différents types d'anémies observées lors des consultations selon leur caractère régénératif ou non. Cette information joue un rôle essentiel dans l'orientation du diagnostic et la prise en charge médicale.

Cependant, la méthode traditionnelle et de référence pour la numération réticulocytaire demeure le comptage manuel après coloration au bleu de crésyl ou le bleu de méthylène nouveau. Bien qu'efficace, cette méthode présente l'inconvénient d'être chronophage et fastidieuse. À la lumière des avancées récentes dans le domaine des automates d'hématologie, il est raisonnable de s'attendre à ce que ces technologies puissent fournir des numérations réticulocytaires fiables. Cependant, pour le SYSMEX XT-2000, des études ont révélé un biais de mesure par rapport à l'ADVIA 120, un autre automate d'hématologie disponible sur le marché (Bauer *et al.*, 2011).

Ainsi, l'objectif de l'étude est de comparer les comptages des réticulocytes des automates d'hématologie disponibles sur le site de l'EnvA, à savoir le SYSMEX XT-2000 et l>IDEXX Procyte DX, avec la méthode de comptage manuelle. Si un biais est mis en évidence, une tentative de développement d'une formule applicable à l'automate utilisé en routine, le SYSMEX XT-2000, sera effectuée pour obtenir une numération correcte.

Cette étude se divise en deux parties distinctes : une revue bibliographique, visant à dresser un état des lieux des méthodes de comptage des réticulocytes, en tenant compte des évolutions techniques au fil des années et des sources d'erreurs associées. Les protocoles de validation des techniques seront également décrits. La seconde partie de l'étude, de nature expérimentale, démontrera la nécessité de mettre en œuvre un modèle mathématique pour obtenir une numération réticulocytaire fiable. Ce modèle sera établi et confirmé à partir de deux échantillons de 50 individus. La méthodologie sera expliquée, analysée et discutée.

Première partie :

1. Importance biologique du réticulocyte

a. Place du réticulocyte au sein de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus essentiel qui assure le renouvellement des hématies sénescents et maintient une masse en globules rouges constante. Selon la classification humaine, l'érythropoïèse comprend six stades de maturations (Olver, 2022). Les érythrocytes (ou globules rouges) regroupent l'ensemble des éléments figurés du sang pouvant s'apparenter à un de ces stades :

1. Proérythrocyte
2. Erythroblaste basophile (correspondant à deux stades de maturation)
3. Erythroblaste polychromatophile
4. Erythroblaste acidophile
5. Réticulocyte
6. Hématie

Tout au long de la maturation de l'érythrocyte, diverses modifications se produisent : une diminution de la taille des cellules, une augmentation de la concentration en hémoglobine, et une augmentation de la condensation de la chromatine. Chez les adultes, le plus souvent, la majorité de l'érythropoïèse se déroule dans la moelle osseuse hématopoïétique jusqu'au stade réticulocytes. La maturation des réticulocytes peut se produire dans le sang périphérique ou dans la rate en plus de la moelle osseuse (Mel *et al.*, 1977 ; Riley *et al.*, 2001).

Lors de la transition de l'érythroblaste acidophile en réticulocyte, un événement clé se produit dans la moelle osseuse hématopoïétique : l'expulsion du noyau, qui est rapidement phagocyté par les macrophages résidents. Lors de la maturation des réticulocytes en hématies, leur volume décroît, et ils expulsent les ARN restant dans leur cytoplasme ainsi que les organites cellulaires (dont les ribosomes contenant des ARN ribosomiaux), entraînant une réduction d'environ 35 % de leur volume cellulaire (Steinberg et Olver, 2005). Lorsque les ribosomes sont colorés avec des colorants tels que le bleu de méthylène nouveau ou le bleu de crésyl, ces ribosomes se colorent, donnant ainsi l'apparence de granulations (Riley *et al.*, 2001).

b. L'anémie : signes cliniques et diagnostic

Les signes cliniques de l'anémie chez l'animal sont variés et comprennent généralement une asthénie, une faiblesse généralisée, une pâleur des muqueuses, un ictère et/ou une hémoglobinurie (Evans et Gruffydd-Jones, 1984) La faiblesse généralisée est causée par une diminution du taux d'hémoglobine circulante dans le sang, ce qui entraîne une mauvaise distribution de l'oxygène aux tissus cibles et se manifeste par une faiblesse. Dans la pratique clinique, une prise de sang est réalisée afin de mesurer l'hématocrite, la concentration de réticulocytes et d'hémoglobine. La mesure

de l'hématocrite permet d'évaluer la présence et la sévérité de l'anémie, comme indiqué dans le Tableau 1 :

Tableau 1 - Classification de la sévérité des anémies en fonction de l'hématocrite chez le chat (d'après (Weiss, 2022))

Classification de l'anémie	Pourcentage d'hématocrite
Légère	20 - 26 %
Modérée	14 - 19 %
Sévère	10 - 13 %
Très Sévère	< 10 %

Des facteurs extérieurs peuvent modifier la valeur d'hématocrite. Par exemple, il convient de noter qu'il existe des variations des valeurs de référence en fonction des races de chat comme le Maine Coon, qui a des intervalles de référence plus haut que le reste des chats (Spada *et al.*, 2015). Un autre élément crucial à considérer est l'état d'hydratation de l'animal, car une déshydratation peut entraîner une augmentation de l'hématocrite ou du taux d'hémoglobine. Il est donc essentiel de prendre en compte ces facteurs lors de l'évaluation clinique et de l'interprétation des résultats sanguins. (Evans et Gruffydd-Jones, 1984).

En médecine, on cherchera les causes de l'anémie pour diagnostiquer une maladie (Tvedten, 2022).

c. Réticulocytes et anémie

Lors de l'observation d'un frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant, on peut distinguer deux populations de réticulocytes chez le chat : les réticulocytes agrégés et les réticulocytes ponctués. Les réticulocytes agrégés sont libérés par la moelle osseuse et mûrissent pour devenir des réticulocytes ponctués. Les réticulocytes ponctués, à leur tour, mûrissent en hématies (Riley *et al.*, 2001). Les réticulocytes agrégés présentent une taille plus importante, une plus grande quantité de mitochondries, de ribosomes et d'organites que les réticulocytes ponctués. Ainsi, au microscope, les réticulocytes ponctués présentent moins d'ARN que les réticulocytes agrégés.

L'érythropoïèse de stress se réfère à la réponse de la moelle osseuse hématopoïétique à un stimulus de stress, tel qu'une perte de sang, une hémolyse ou une gestation. Chez un patient sain, la compensation des pertes en hématies est attendue par activation de l'érythropoïèse. Le nombre de réticulocytes est un indicateur de l'intensité de la réponse de la moelle osseuse dans ce processus. (Ingram et Coopersmith, 1969).

Cependant, en cas de stimulus induisant un stress érythropoïétique, la moelle osseuse libère des réticulocytes moins matures que ceux libérés dans un contexte normal (Steinberg et Olver, 2005).

Chez le chat, la maturation des réticulocytes agrégés en réticulocytes ponctués dure environ 12 heures, cette durée est courte et permet d'évaluer l'intensité de la réponse de la moelle osseuse. Il est donc possible d'affiner le diagnostic d'une anémie régénérative en prenant en compte les deux populations chez le chat. Par exemple, la présence d'un grand nombre de réticulocytes ponctués et d'un faible nombre de réticulocytes agrégés est le signe d'une régénération qui a été intense mais qui n'est plus en cours. (Cowgill *et al.*, 2003) En pratique, des classifications existent pour les

anémies en fonction de ces deux populations, comme le montre le Tableau 2. Mais seulement la numération de réticulocytes agrégés est utilisée car ce sont ceux qui représentent réellement la régénération et l'apport de l'information sur les réticulocytes ponctués est finalement limité. (Winzelberg Olson et Hohenhaus, 2019) :

Tableau 2 - Classification des anémies en fonction des taux de réticulocytes (d'après Cowgill et al., 2003)

	Qualification de la régénération	Réticulocytes agrégés	Réticulocytes ponctués
<i>Pourcentage de réticulocytes</i>	Aucune	0-0.4 %	1-10 %
	Légère	0.5-2 %	10-20 %
	Modérée	3-4 %	20-50 %
	Marquée	> 5 %	> 50%
<i>Comptage absolu</i>	Aucune	< 15 000 - 42 000 / uL	< 200 000 /uL
	Légère	42 000 - 70 000 /uL	200 000 - 500 000 /uL
	Modérée	70 000 - 100 000 /uL	500 000 - 1000 000 /uL
	Marquée	> 200 000 /uL	1 000 000 - 1 500 000 /uL

2. Le comptage manuel

Les réticulocytes comportent dans leur cytoplasme de l'ARN ribosomal qui réagit avec des solutions isotoniques de colorants supravitaux comme le bleu de crésyl brillant en devenant un réseau bleu foncé très marqué (Giri, 2018). Concernant la préparation du frottis sanguin, voici la procédure à suivre :

1. Prélever 2 gouttes de bleu de crésyl brillant ou de bleu de méthylène nouveau
2. Mélanger cette solution avec le même volume de sang prélevé sur éthylènediaminetétraacétique (EDTA) dans l'échantillon.
3. Incuber le mélange à 37°C pendant 10 à 15 minutes.
4. Réaliser un frottis de la préparation obtenue sur une lame de microscope
5. Examiner et compter les réticulocytes et les hématies

Pour compter les réticulocytes sur un frottis sanguin, il est nécessaire de se positionner dans la monocouche de globules rouges du frottis. On utilise un compteur cellulaire et un microscope à objectif x100 à huile à immersion pour compter directement les réticulocytes à la main (Figure 1). Mille globules rouges sont comptés, les réticulocytes ponctués et les réticulocytes agrégés sont enregistrés séparément. En pratique, seulement les réticulocytes agrégés sont enregistrés.

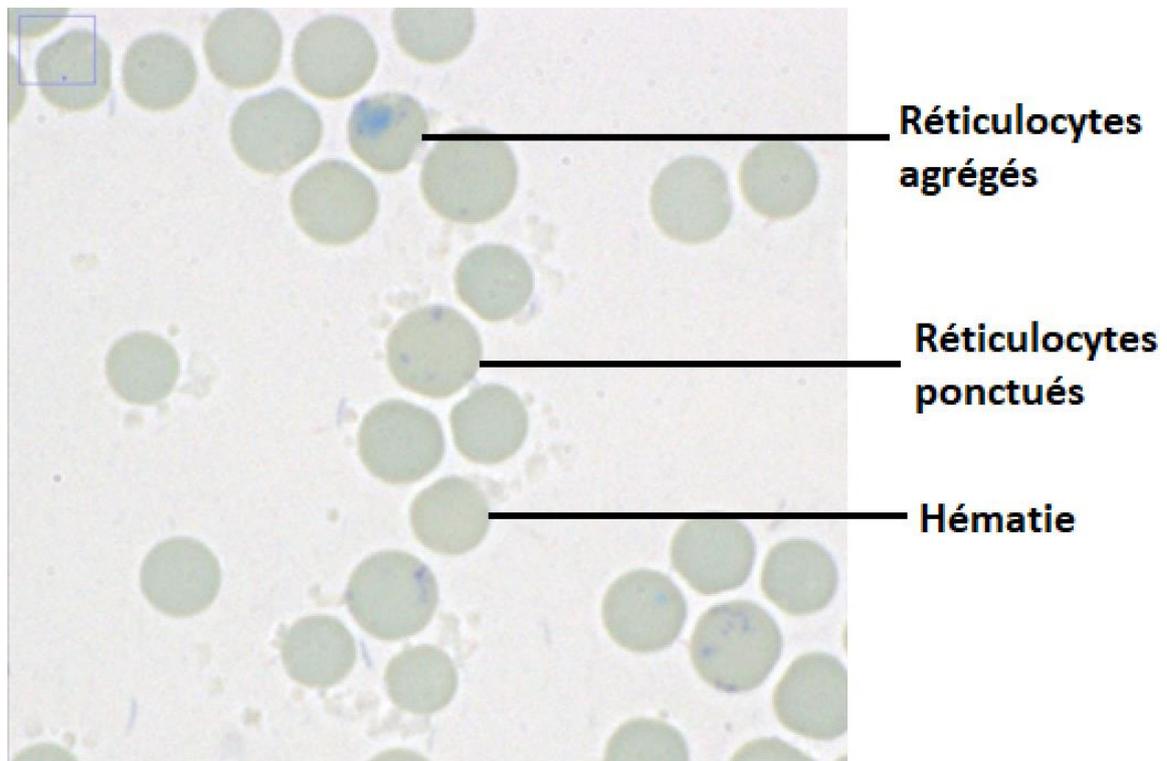


Figure 1 - Champ d'un frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant (x1000)

Dans le cadre de cette étude, la définition des réticulocytes agrégés et des réticulocytes ponctués est basée sur les travaux antérieurs réalisés sur le SYSMEX XT-2000. Ainsi, un réticulocyte ponctué est caractérisé par la présence de 3 à 15 ponctuations sans la présence d'un réseau, tandis qu'un réticulocyte agrégé est défini par la présence de plus de 15 ponctuations ou d'un réseau. (Lilliehöök et Tvedten, 2009). Cette définition a été choisie en raison des nombreux travaux de cette équipe sur le SYSMEX XT-2000 chez le chat. Ce n'est pas un consensus, d'autres définitions existent. Les réticulocytes agrégés peuvent parfois être seulement définis par la présence d'un réseau (Peebles *et al.*, 1981). Ce manque de consensus nous oblige à prendre des décisions arbitraires sur la définition des réticulocytes.

On peut ensuite déterminer le pourcentage de réticulocytes (en %), qu'ils soient ponctués ou agrégés selon la formule suivante (Giri, 2018):

$$\text{Pourcentage de réticulocytes} = \frac{\text{Nombre de réticulocytes comptés}}{\text{Nombre total de globules rouges}} \times 100\%$$

Le comptage manuel est considéré comme la méthode de référence pour obtenir une numération réticulocytaire chez le chat (Reagan *et al.*, 1992). Lors du comptage manuel, deux variables indépendantes sont obtenues :

- % de réticulocytes agrégés ;
- % de réticulocytes ponctués ;

Notons que la somme des pourcentage des deux types de réticulocytes donnent le pourcentage total en réticulocytes : % réticulocytes.

Le pourcentage de réticulocytes permet de calculer le taux de réticulocytes corrigé, variable intéressante lors d'anémie et de d'hématocrite.

En effet, lors d'anémie, le taux de réticulocytes peut être faussement diminuer en raison du taux de globules rouges faible. La numération réticulocytaire corrigée permet de s'affranchir de ce problème :

$$\text{numération réticulocytaire corrigée} = \frac{\text{pourcentage de réticulocytes} \times \text{Hématocrite (patient)}}{\text{Hématocrite (référence)}}$$

Hématocrite (référence) étant le taux d'hématocrite chez un patient non anémié (Giri, 2018).

Cependant, en raison de sa longue durée d'exécution, pour un seul cas (coloration comprise), le comptage manuel est très rarement réalisé dans les cliniques vétérinaires généralistes qui peuvent en revanche s'équiper, depuis une vingtaine d'années, d'automates d'hématologie comptant les réticulocytes.

3. Le comptage automatique par cytométrie de flux et fluorescence optique

a. Principe

Le comptage automatisé des réticulocytes se fait par cytométrie de flux. La cytométrie de flux peut être brièvement décrite comme la mesure des caractéristiques d'une cellule en fonction de la lumière qu'elle réfracte après avoir été exposée à un laser dans un liquide spécifique (Reagan *et al.*, 1992). Cette technologie a été progressivement introduite dans les automates d'hématologie, elle a été couplée à la technique de fluorescence optique. L'échantillon sanguin est d'abord mélangé à une solution contenant un fluorochrome qui peut être excité par le laser. Dans le cas de l'IDEXX Procyte Dx utilisé dans cette étude, le réactif utilisé est un diluant contenant du tampon tricine à 0,18% (IDEXX Laboratories, 2021).

L'appareil possède une buse de focalisation de forme conique qui permet le passage individuel de chaque cellule face au laser (Figure 2) (Mayol *et al.*, 2020).

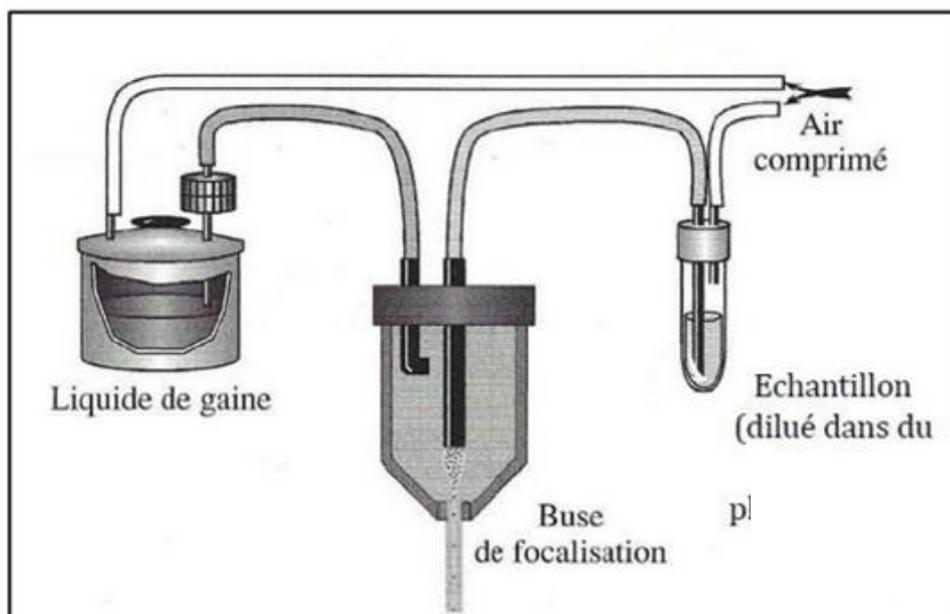


Figure 2 - Schéma d'une buse de focalisation (Crédit : Mayol et al., 2020)

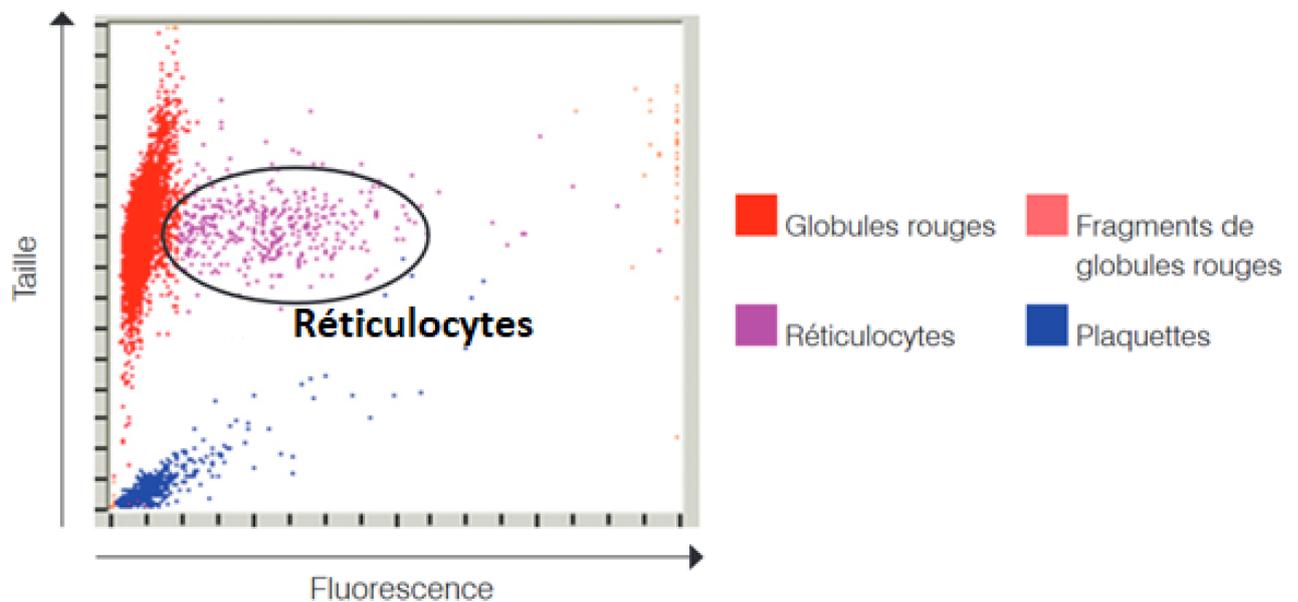
Le fluorochrome va teinter les acides nucléiques des réticulocytes. Les réticulocytes sont ensuite engagés dans la buse, où un laser sera projeté. Il sera plus ou moins diffracté en fonction de la taille et la complexité interne d'une cellule. Le volume, et la densité des acides nucléiques présents au sein de la cellule sont eux évaluée par la fluorescence de cette dernière due au fluorochrome. (Reagan *et al.*, 1992).

Lors de l'utilisation de la cytométrie de flux couplée à la diffusion du laser, un miroir est positionné à un angle de 90° pour mesurer la diffusion de la lumière, fournissant ainsi des informations telles que le rapport nucléo-cytoplasmique.

Le laser des automates excite le fluorochrome préalablement mélangé à l'échantillon. Plus la cellule contient d'acides nucléiques, plus la fluorescence renvoyée sera intense. Les réticulocytes vont donc être classés en trois catégories par les automates en fonction de leur fluorescence : les réticulocytes à haute fluorescence (HFR), les réticulocytes à fluorescence moyenne (MFR) et les réticulocytes à faible fluorescence (LFR). La maturité des réticulocytes est généralement plus élevée lorsque leur contenu en acides nucléiques est faible, ainsi, les LFR sont les réticulocytes les plus matures et les HFR les réticulocytes les moins matures.

Pour l'IDEXX Procyte Dx, le colorant utilisé est le thiazole orange, administré à une concentration de 0,2 µg/mL dans l'échantillon. Le logiciel de l'automate est capable de classer les cellules en fonction de leur taille et de leur fluorescence, ce qui permet d'obtenir un nuage de points (Figure 3)

pour chaque population cellulaire identifiée par l'automate. Chaque point du nuage de points correspond à une cellule :



Cependant, la détection des réticulocytes ponctués par cytométrie de flux n'a jamais été précise. L'utilisation de la cytométrie de flux est donc plutôt utilisée pour le comptage des réticulocytes agrégés (Reagan *et al.*, 1992). Plusieurs auteurs ont constaté qu'à de très faibles taux de réticulocytes, la corrélation entre la cytométrie de flux couplée à la fluorescence optique et le comptage manuel n'est plus linéaire (Schimenti *et al.*, 1992). Il semble que les conditions utilisées en cytométrie de flux ne soient pas suffisantes pour détecter les faibles quantités d'ARN dans les cellules.

Les automates utilisant la cytométrie de flux présentent l'avantage de fournir des analyses sanguines rapides (jusqu'à 80 analyses par heure pour le SYSMEX XT-2000), de réduire la variabilité de lecture et d'analyser un plus grand nombre de cellules (environ 10 000 avec un automate contre 1 000 en comptage manuel (NCCLS, 2004)).

L'accès à ces technologies est de plus en plus répandu en clinique. Ces automates sont utilisés par de nombreux vétérinaires dans leur pratique quotidienne et il est donc nécessaire de garantir la fiabilité des résultats obtenus par ces dispositifs.

b. Le IDEXX Procyte DX



Figure 4 - Automate de comptage IDEXX Procyte DX (Crédit : Idexx)

Le IDEXX Procyte Dx (Figure 4) , développé par la société IDEXX en collaboration avec SYSMEX, est un des analyseurs d'hématologie les plus répandus dans les cliniques vétérinaires (IDEXX, 2023). Il utilise la cytométrie en flux, comme le SYSMEX XT-2000. Il existe de très bon coefficient de corrélation pour le comptage des numérations réticulocytaires totale et le pourcentage de réticulocytes chez le chat entre l'IDEXX Procyte DX et le comptage manuel (Fujino *et al.*, 2013).

Chez le chat, cet automate présente de bonnes performances concernant la mesure des différentes lignées de globules blancs, de l'hématocrite et la numération érythrocytaires. Cependant, il est important de noter qu'il existe des problèmes de comptage des plaquettes en raison de la présence fréquente d'agrégats plaquettaires, même chez les chats en bonne santé (Fujino *et al.*, 2013). De manière générale, il est recommandé de réaliser un comptage manuel pour obtenir des numérations réticulocytaires ponctués et agrégés précises, et l'IDEXX Procyte DX ne peut pas se substituer à cette étape car seule une correspondance correcte pour la numération réticulocytaire et le pourcentage de réticulocytes est démontrée pour l'IDEXX Procyte DX (Fujino *et al.*, 2013).

En ce qui concerne les réticulocytes, les variables fournies par l'IDEXX Procyte DX, leur signification, ainsi que la méthode utilisée sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 - Variables données par le IDEXX Procyte Dx concernant les réticulocytes (d'après C. Boudu, 2020)

Nom du paramètre	Signification	Unité	Méthode d'obtention
RET	Numération réticulocytaire	10 ³ / uL	Cytométrie de flux et fluorescence optique
%Ret	Pourcentage de réticulocytes par rapport au nombre de globules rouges Soit Réticulocytes/Globules rouges x100	%	Cytométrie de flux et fluorescence optique
LFR	Low Fluorescence Ratio : Pourcentage de réticulocytes de basse fluorescence, les plus matures, car avec le moins de matériel nucléaire. Soit LFR/RET x 100	%	Cytométrie de flux et fluorescence optique
MFR	Medium Fluorescence Ratio : Pourcentage de réticulocytes de fluorescence moyenne. Soit MFR/RET x 100	%	Cytométrie de flux et fluorescence optique
HFR	High Fluorescence Ratio : Pourcentage de réticulocytes de fluorescence haute, les moins matures, car avec le plus de matériel nucléaire. Soit HFR/RET x 100	%	Cytométrie de flux et fluorescence optique

Les paramètres spécifiques qui nous intéressent sont ceux qui permettront de faire le lien avec les mesures de réticulocytes agrégés et ponctués obtenues manuellement. L'automate donne également le pourcentage de réticulocytes dans l'échantillon (%Ret).

Une étude portant sur 153 cas a démontré que la numération réticulocytaire fournie par le IDEXX Procyte Dx était en accord avec celle obtenue par comptage manuel uniquement chez le chat anémié (Baudu *et al.*, 2020).

Dans leur article, l'équipe de Fujino a validé l'utilisation du IDEXX Procyte Dx en se basant sur le coefficient de corrélation de Spearman. Ce coefficient n'est pas celui retenu par l'ASCVP pour valider une méthode de mesure (Arnold *et al.*, 2019). L'imprécision de l'IDEXX Procyte Dx dans la mesure des réticulocytes est de 15% (IDEXX Laboratories, 2021).

c. Le SYSMEX XT-2000



Figure 5 - Automate de comptage SYSMEX XT-2000 (Crédit : SYSMEX)

L'utilisation de la cytométrie en flux fluorescente pour le comptage des réticulocytes a démontré son efficacité grâce à l'utilisation de l'automate d'hématologie SYSMEX XT-2000 (Figure 5) chez les carnivores domestiques (Langford *et al.*, 2003). L'intensité de la fluorescence permet de distinguer les différents degrés de maturité des réticulocytes (SYSMEX EUROPE SE, 2021). Cette technique a été validée pour son utilisation en hématologie vétérinaire chez le chat (Lilliehöök et Tvedten, 2009).

Les performances du SYSMEX XT-2000 sont comparables à celles de l'ADVIA® 2120, automate présentant de bonnes concordances de mesures pour l'ensemble des variables qu'il mesure par rapport au comptage manuel. Cependant, il semble présenter des biais dans le comptage des réticulocytes (Bauer *et al.*, 2011). De plus, le SYSMEX XT-2000 ne permet pas d'obtenir une numération réticulocytaire exacte (Lilliehöök et Tvedten, 2009) et il est impossible de distinguer les réticulocytes agrégés des réticulocytes ponctués. Le SYSMEX XT-2000 présente un biais positif de 6% et aucun article n'a pu démontrer de manière concluante sa capacité à fournir une numération réticulocytaire exacte chez le chat, et la méthode gold standard reste le comptage manuel. Cet automate est néanmoins utilisé en routine et sa fiabilité concernant les numérations réticulocytaires est importante à démontrer.

Plusieurs pistes existent pour expliquer cette discordance entre les mesures. Celle avancée le plus fréquemment est une inaptitude du SYSMEX XT-2000 à différencier correctement des cellules présentant une morphologie similaire (Pinto da Cunha *et al.*, 2009).

Les variables obtenues concernant les réticulocytes sont identiques à celles données par l'IDEXX Procyte Dx (Tableau 3). Les coefficients de variation (CV) de chaque variable en lien avec les réticulocytes sont récapitulés dans le Tableau 4 (Weissenbacher, 2009).

Tableau 4 - D'après Weissenbacher, coefficients de variabilités des variables données par le SYSMEX XT-2000

Variables	Faible taux		Taux Fort	
	Moyenne	CV (%)	Moyenne	CV (%)
Ret x10 ³ /uL	33,08	6,36	206,25	6,81
RET%	0,78	6,44	2,52	6,8
LFR%	95,69	2,11	89,31	3,28
MFR%	3,44	44,19	8,76	28,72
HFR%	0,87	88,06	1,93	30,41

4. Sources d'erreurs de ces méthodes de mesures

Des changements morphologiques sont la principale piste permettant d'expliquer les discordances de mesures des automates de comptage (Pinto da Cunha *et al.*, 2009).

a. Corps de Howell-Jolly

Les corps de Howell-Jolly (Figure 6) sont des structures observées dans les hématies. Ils résultent généralement de noyaux résiduels lors de la maturation des hématies. Normalement, ces corps sont éliminés par la rate, ainsi, chez les patients ayant subi une splénectomie ou présentant une affection de la rate, ils peuvent être rencontrés plus fréquemment. Jusqu'à 5% des hématies des chats sains peuvent présenter ces inclusions (Weiss, 2022).

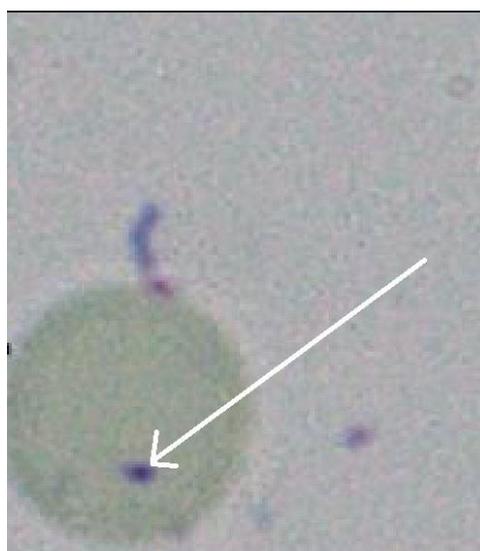


Figure 6 - Corps Howell Jolly un frottis sanguin à la coloration Bleu de Crésyl (x1000)

Ils sont facilement identifiables à l'observation microscopique (méthode manuelle de comptage des réticulocytes), alors que les automates d'hématologie les identifient difficilement.

b. Corps de Heinz

Les corps de Heinz (Figure 7) sont des inclusions présentes à l'intérieur de la membrane des hématies et sont généralement formés par la dénaturation de l'hémoglobine. Ils sont colorés par le bleu de crésyl brillant et bleu de méthylène nouveau alors que ce ne sont pas des acides nucléiques. Les corps de Heinz sont de taille plus importante que les résidus d'ARN présents dans les réticulocytes, ce qui permet de les identifier par observation au microscope (Herman et Javaid, 2022).

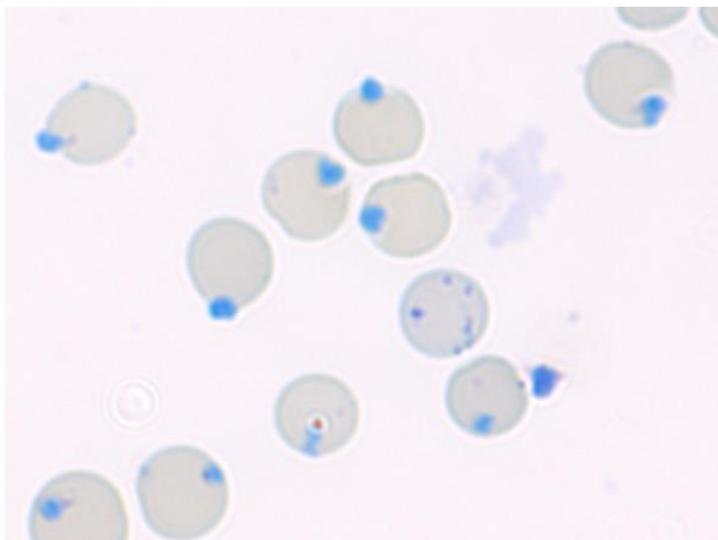


Figure 7 - Corps de Heinz sur un frottis sanguin à la coloration Bleu de Crésyl (x1000)

c. Inclusions basophiles

Les inclusions basophiles (Figure 8) correspondent à de l'accumulation d'ARN dans le cytoplasme des hématies, parfois confondues avec de l'accumulation de fer. Les causes sont : intoxication, anémie hémolytique (Cheson *et al.*, 1984).

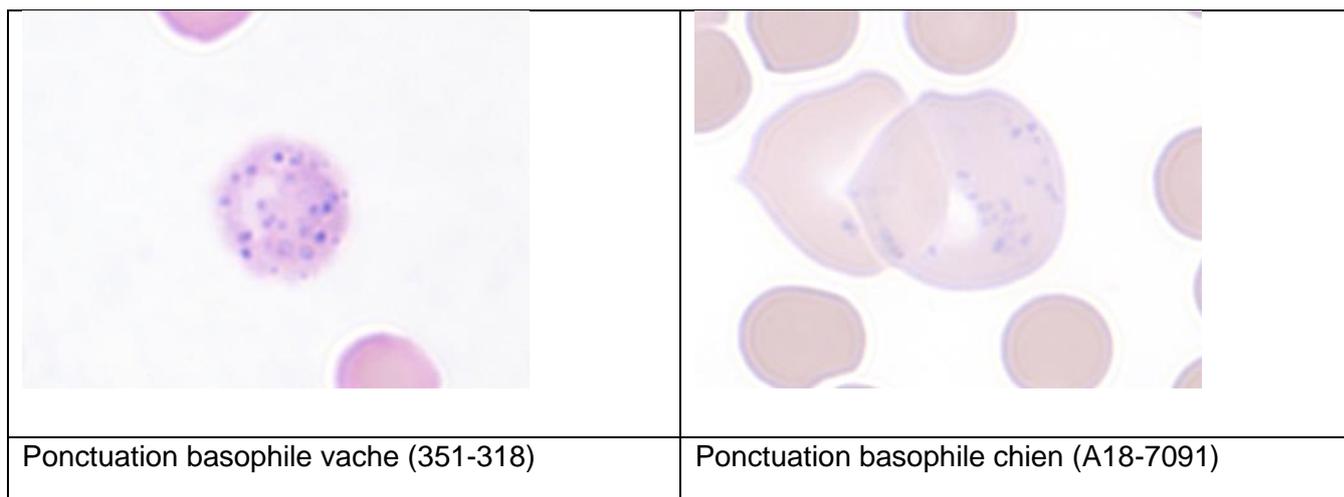


Figure 8 - Inclusions basophiles sur des frottis sanguins colorés à la coloration may-grunwald-giemsa (MGG) (x1000)

Ces corps sont souvent accompagnés d'une augmentation de la numération réticulocytaire (CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE, 2023).

d. Infection à *Mycoplasma*

Les mycoplasmes (Figure 9) sont des bactéries gram-négatif de petite taille qui joue un rôle prépondérant dans le développement de l'anémie hémolytique à médiation immunitaire chez le chat. Cette bactérie a la capacité d'altérer la morphologie des hématies. Ainsi, la présence de mycoplasmes peut introduire des biais ou des interférences dans l'analyse cytométrique des échantillons sanguins, et donc sur les numérations réticulocytaires obtenues (CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE, 2023).

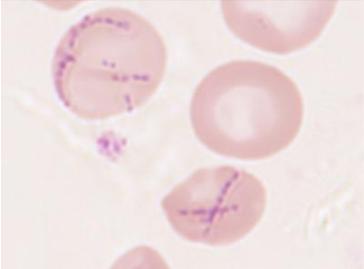
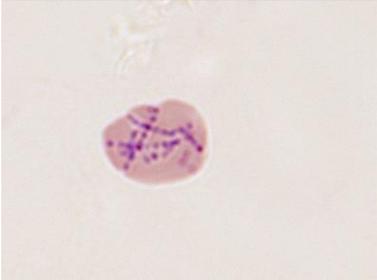
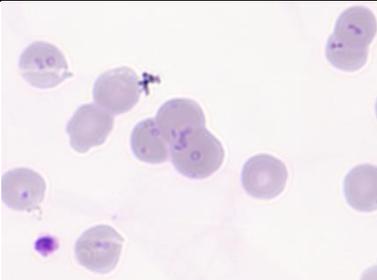
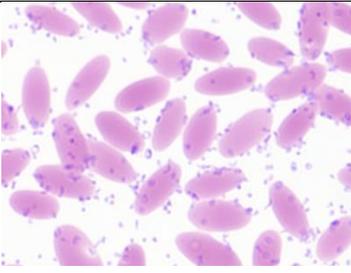
	
<i>Mycoplasma haemocanis</i> chien	<i>Mycoplasma haemocanis</i> chien
	
<i>Mycoplasma</i> sp chat	<i>Mycoplasma</i> sp chat
	
<i>Mycoplasma haemolamae</i> lama	<i>Mycoplasma haemolamae</i> lama

Figure 9 - Hématies présentant des infections à mycoplasme, frottis sanguin coloré à la coloration MGG (x1000)

e. Autres cellules présentes dans l'échantillon

Des plaquettes immatures présentant une taille importante (macroplaquettes), des fractions d'ARN (plaquettes réticulées) ou des globules blancs immatures peuvent altérer les mesures faites par les automates de comptage (Ivory *et al.*, 2007 ; Riley *et al.*, 2001).

5. Bilan

Les propriétés des différents instruments et méthodes de mesure sont récapitulées dans le Tableau 5 :

Tableau 5 - Récapitulatif des propriétés des différents instruments et méthodes de mesure des réticulocytes

	IDEXX Procyte Dx	SYSMEX XT-2000	Comptage manuel
Echantillon nécessaire	1 prise de sang prélevé sur EDTA		Quelques gouttes de sang prélevé sur EDTA
Méthodes utilisées	Cytométrie de Flux Fluorescence optique		Bleu de Crésyl ou Bleu de Méthylène nouveau puis réalisation d'un frottis sanguin
Nombre de cellules comptées	10 000 cellules		1 000 à 2 000 cellules
CV%	20 % (Baudu <i>et al.</i> , 2020)	6,4 - 6,8 % (Weissenbacher, 2009)	15 - 20 % (Baudu <i>et al.</i> , 2020)
Validé dans la littérature	Oui	Non	Méthode de référence
Temps de réalisation	2 minutes	45 secondes	15 minutes
Valeurs obtenues	<ul style="list-style-type: none"> - Ret % - HFR % - MFR % - LFR % 		<ul style="list-style-type: none"> - Ret % - Réticulocytes Agrégés % - Réticulocytes Ponctués %
Sources d'erreur expliquant une partie des biais	Corps de Heinz Corps de Howell Jolly Inclusions basophiles <i>Mycoplasma felis</i> Leucocytes Macroplaquettes		Corps de Heinz Inclusions basophiles <i>Mycoplasma felis</i> Répartition hétérogène des réticulocytes sur le frottis

Lors de l'interprétation des numérations réticulocytaires obtenus à l'aide d'automates, il est crucial de prendre en compte les limitations et potentielles imprécisions de la méthode utilisée, en particulier les éventuels problèmes d'identification des cellules par les automates.

6. Intérêt de notre étude

L'utilisation d'automates de comptage permet de gagner du temps par rapport aux méthodes manuelles de comptage sur frottis sanguins, ce qui est particulièrement avantageux pour les praticiens qui réalisent le plus souvent les analyses pendant ou en marge de la consultation, ainsi que pour les laboratoires en termes de rentabilité et de prix des analyses.

Pour les chats anémiés, il existe une concordance correcte entre les variables fournies par l'IDEXX Procyte DX et le comptage manuel (Baudu *et al.*, 2020). Cet automate sera donc utilisé pour quantifier le biais du SYSMEX XT-2000.

Contrairement à l'IDEXX Procyte Dx, le SYSMEX XT-2000 ne peut fournir des numérations réticulocytaires fiables chez le chat. Un biais a été identifié et des sources d'erreurs ont été identifiées pour l'expliquer. Notre objectif est donc de quantifier précisément ce biais et de déterminer s'il exerce une influence significative sur la prise en charge clinique des animaux suite à l'analyse sanguine. Une fois ce biais quantifié, nous tenterons d'élaborer des critères et des formules pour obtenir des taux de réticulocytes corrects en le prenant en compte.

Dans cette étude expérimentale, nous avons plusieurs objectifs :

- **Mettre en évidence une discordance entre les mesures des deux automates de comptage, quantifier le biais entre les mesures de numération réticulocytaire obtenues par l'IDEXX Procyte Dx et le SYSMEX XT-2000, et évaluer qualitativement son impact clinique ;**
- **A partir de deux échantillons de 50 individus, mettre en place un modèle mathématique pour permettre l'obtention d'un taux réticulocytaire ajusté selon les critères de l'ASCPV avec le SYSMEX XT-2000 par rapport à celui obtenu par la méthode gold standard : le comptage manuel.**

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Le but de cette étude est de réévaluer la concordance entre les différentes méthodes de comptage des réticulocytes (Desquilbet, 2012). Dans un premier temps, nous quantifions la discordance entre les mesures obtenues par les automates IDEXX Procyte Dx et SYSMEX XT-2000. Ensuite, grâce à une régression linéaire multiple, nous développons une nouvelle méthode de mesure basée sur une équation afin de corriger le biais conformément aux directives de l'ASVCP (American Society for Veterinary Clinical Pathology).

2. Matériels et méthodes

a. Sélection des cas

L'échantillon sélectionné pour cette étude comprend des prélèvements sanguins veineux de chats suivis en consultation au centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort (ChuvA), collectés dans des tubes EDTA, en vue d'une analyse de la formule sanguine complète (NFS), réalisée au Biopôle de l'École vétérinaire d'Alfort (EnvA). Pour chaque cas, une NFS est réalisée à la fois sur les automates de comptage SYSMEX XT-2000 et IDEXX Procyte Dx. La condition d'inclusion dans l'étude est que l'hématocrite du chat, calculé sur l'automate IDEXX Procyte Dx, soit inférieur à 26%, indiquant une anémie (Hathaway, 1976). Ces cas sont suivis en consultation entre février 2021 et décembre 2021.

La population cible était donc définie comme suit : « *les chats ayant subi un prélèvement sanguin veineux au ChuvA, dont l'échantillon a été analysé au biopôle de l'EnvA, et présentant un taux d'hématocrite inférieur à 26% sur l'automate IDEXX Procyte Dx, entre février 2021 et décembre 2021* ».

Un frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant a été réalisé pour chaque cas.

Finalement, 104 cas sont être inclus dans l'étude.

b. Critères d'exclusions

Quatre cas sont exclus de l'étude en raison d'une mauvaise qualité du frottis sanguin coloré au bleu de crésyl brillant, ce qui rend impossible une visualisation correcte des cellules.

c. Méthode manuelle

Nous utilisons des lames colorées au bleu de crésyl brillant, chaque lame étant placée sous un microscope optique numérique Zeiss, équipé du logiciel Zen 3.5 (Zeiss Group International, 2023). Des mosaïques d'images sont capturées à un grossissement de x1000 avec huile à immersion (Figure 10). L'emplacement de chaque mosaïque est sélectionné de manière à inclure une région représentative de la zone de lecture. De plus, la taille de chaque mosaïque est choisie de manière à garantir la présence d'au moins 1 000 globules rouges à compter.

Cette approche nous permet de bénéficier des avantages de la technologie numérique pour l'acquisition des images, comme le marquage des cellules et de fractionner le comptage des cellules d'une seule lame et d'utiliser des logiciels informatiques pour faciliter le comptage et l'analyse des données.

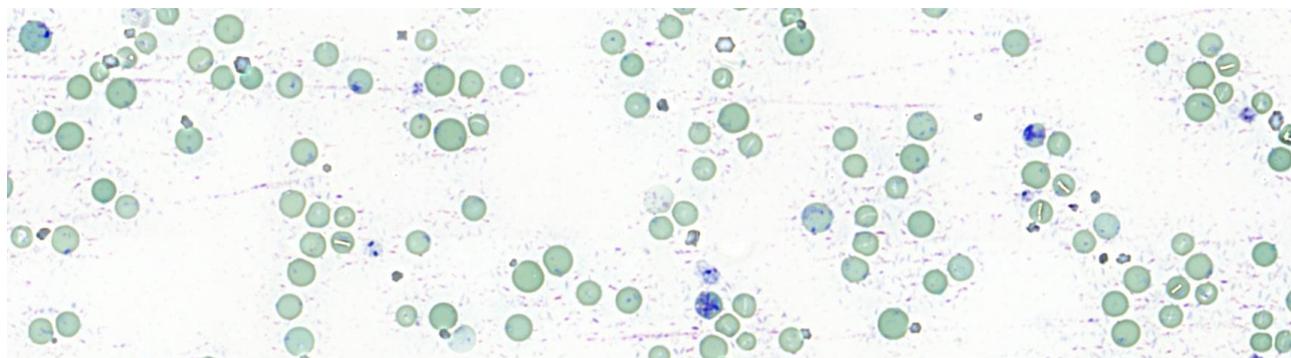


Figure 10 - Partie d'une mosaïque d'image de frottis sanguin de chat anémié coloré au bleu de crésyl brillant (x1000)

Dans notre étude, l'opérateur utilise le logiciel ImageJ (ImageJ, 2023), associé au plugin Cellcounter (De Vos, 2023), pour effectuer le comptage des cellules. L'opérateur procède au comptage des réticulocytes et des hématies jusqu'à atteindre un total de 1 000 globules rouges, en utilisant la fonction CellCounter qui permet de compter les cellules par pointage (Figure 11) : les hématies d'une part, les réticulocytes agrégés ainsi que les réticulocytes ponctués d'autre part.

Selon la définition donnée par l'équipe de Lillihook *et al.* (Lilliehöök et Tvedten, 2009), un réticulocyte ponctué est caractérisé par la présence de 3 à 15 ponctuations et l'absence d'agrégation d'ARN ribosomal. En revanche, un réticulocyte agrégé présente plus de 15 ponctuations ou un réseau ribosomal. Nous adoptons cette définition pour nos comptages au cours de l'expérimentation.

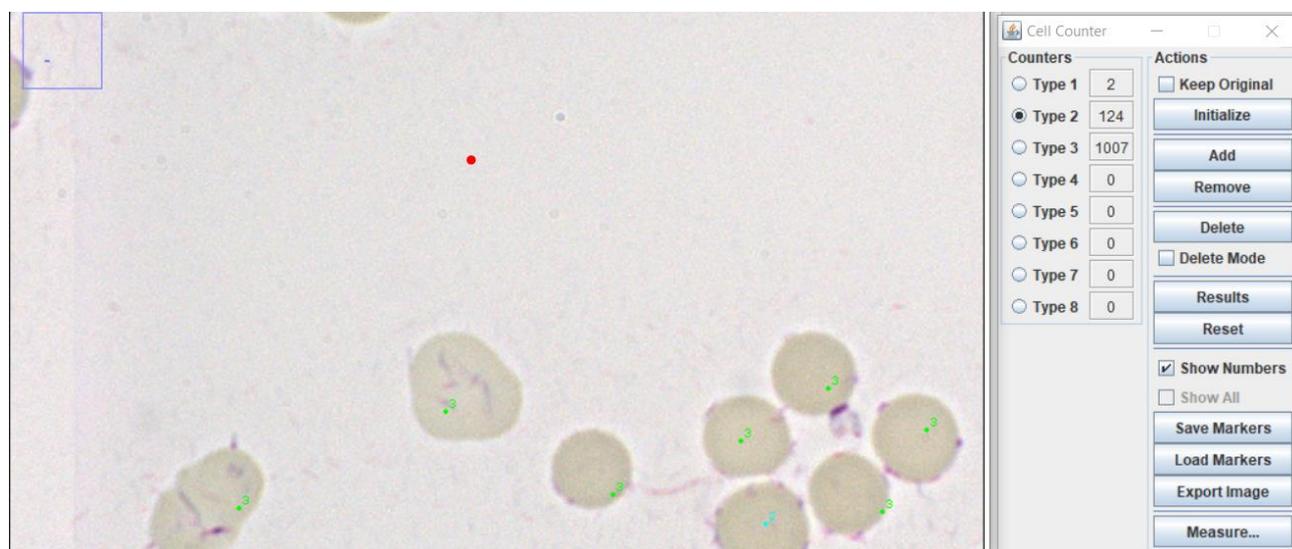


Figure 11 - Exemple d'un comptage manuel avec CellCounter, plugin d'ImageJ (Légende : type 1 = réticulocyte agrégé, type 2 = réticulocyte ponctué, type 3 = hématie)

Pour chaque lame, trois valeurs sont donc prises en compte grâce au comptage manuel : le pourcentage de réticulocytes, le pourcentage de réticulocytes agrégés, le pourcentage de réticulocytes ponctués.

d. Objectif 1 : Objectiver et quantifier le biais du SYSMEX XT-2000

a. IDEXX Procyte Dx

Avant de procéder à l'analyse, le tube contenant l'échantillon sanguin est homogénéisé dans un agitateur rotatif pendant 5 minutes afin d'assurer une répartition uniforme des cellules. Ensuite, un prélèvement est effectué pour réaliser le frottis sanguin, tandis que le reste du sang est placé dans l'automate pour l'analyse hématologique. Outre le taux de réticulocytes, trois paramètres sont relevés pour notre étude : HFR, MFR et LFR.

b. SYSMEX XT-2000.

L'analyse est réalisée après celle du IDEXX Procyte DX. Les variables qui nous intéressent sont les mêmes que celles du IDEXX Procyte Dx.

c. Extraction des données des automates

Les données brutes sont récupérées par clé USB sous format .csv à partir des deux automates de comptage, ce qui a permis ensuite de mettre en commun les différentes variables mesurées par les automates dans Microsoft Excel 2018 (Microsoft).

d. Calcul des coefficients de variabilité

Le premier quartile du pourcentage de réticulocytes pour l'IDEXX Procyte Dx est 0,6%. Le dernier quartile est 4%.

Les coefficients de variations sont calculés sur trois échantillons pour le SYSMEX XT-2000. Un échantillon a un taux faible de réticulocytes (< 0,6 %), un échantillon a un taux moyen (0,6-4%) et un échantillon a un taux fort (> 4%). Ils sont chacun passés 10 fois dans l'automate.

Les coefficients de variation sont calculés sur deux échantillon pour l'IDEXX Procyte Dx. Un échantillon a un taux moyen de réticulocyte total (0,6-4%) et un échantillon a un taux fort (> 4%). Ils sont chacun passés 10 fois dans l'automate.

Pour la méthode manuelle, les coefficients de variation du pourcentage de réticulocytes totaux, agrégés et ponctués sont calculés sur trois frottis de bonne qualité. Un frottis a un taux bas de réticulocyte totaux (<10%), un autre a un taux moyen (10-40%) et un dernier a un taux élevé de réticulocytes (>40%). Sur chacune des lames, 10 comptages successifs sont effectués par l'opérateur, le coefficient de variabilité est ensuite calculé pour chaque variable obtenue par le comptage manuel.

e. Coefficient de concordance de Lin

Le coefficient de concordance de Lin est un coefficient permettant de quantifier une concordance entre deux séries de mesures (Lin, 1989), il est utilisé pour comparer les différentes séries de mesures obtenues par l'IDEXX Procyte DX et le SYSMEX XT-2000. La valeur de ce coefficient est comprise entre -1 et 1 (-1 correspondant à une discordance parfaite, 0 correspondant à une concordance nulle et 1 à une concordance parfaite). En fonction de la valeur de ce coefficient, une appréciation subjective de ce dernier existe (Tableau 6).

Tableau 6 - Interprétation du coefficient de concordance de Lin (d'après (Landis et Koch, 1977))

Coefficient de Lin	Appréciation (Landis et Koch, 1977)
< 0	Très mauvais (Poor)
0-0.20	Mauvais (Slight)
0.21-0.40	Passable (Fair)
0.41-0.60	Moyenne (Moderate)
0.61-0.80	Bonne (Substantial)
0.81-1.00	Très bonne (Almost perfect)

f. Graphique de Bland et Altman (Bland et Altman, 1986)

Le graphique de Bland et Altman a pour objectif de comparer la concordance entre deux ensembles de mesures effectuées par des méthodes ou des automates différents pour un même individu. Il présente la moyenne des valeurs mesurées par les deux méthodes sur l'axe des abscisses, et la différence entre les valeurs obtenues par les deux méthodes sur l'axe des ordonnées. Deux critères doivent être satisfaits pour considérer que deux méthodes de mesure sont concordantes (Tableau 7).

- *Biais systématique*

C'est le premier critère de la méthode de Bland et Altman. Pour considérer que deux méthodes de mesure sont concordantes, il est essentiel que le biais systématique observé ne soit pas significatif. En d'autres termes, l'intervalle de confiance à 95% de ce biais doit inclure la valeur 0. Dans notre étude, le biais maximum acceptable est 10% d'après les recommandations ASVCP (Nabity *et al.*, 2018).

- *Droites d'agrément*

C'est le deuxième critère de la méthode de Bland et Altman : 95% des écarts entre chaque mesure doivent être considérés comme « acceptables ». C'est-à-dire que moins de 5% des points sont hors de l'intervalle entre ces droites d'agrément. Dans le cadre de notre étude, les limites d'agrément sont respectivement 15% et -15% pour s'aligner sur les recommandations ASVCP (Nabity *et al.*, 2018).

- *Intervalle de confiance*

Soit SD l'écart-type et n le nombre d'individus utilisés pour dresser le graphique de Bland et Altman, l'intervalle de confiance à 95% du biais est :

$$I = [\text{biais} - 1,96 \frac{SD}{\sqrt{n}} ; \text{biais} + 1,96 \frac{SD}{\sqrt{n}}]$$

Tableau 7 - Critère de Bland et Altman de notre étude

Critères de Bland et Altman	% de Réticulocytes
1 ^{er} critère, biais maximum acceptable	10%
2 ^{ème} critère, zone d'agrément maximum acceptable	[-15% ; 15%]

g. Validation d'une méthode selon l'ASVCP

- *Démarche*

Dans le cadre de notre étude comparative entre le IDEXX Procyte Dx et le SYSMEX XT-2000, nous suivons les recommandations de l'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) pour évaluer et comparer ces deux méthodes de mesure. Selon les recommandations, les critères suivants doivent être respectés :

- Un minimum de 40 échantillons doit être utilisé pour la comparaison.
- Les échantillons doivent être analysés sur les deux machines dans les deux heures suivant la première analyse
- Un graphique de Bland-Altman est construit pour évaluer l'accord entre les deux méthodes.
- Un diagramme est réalisé pour évaluer l'impact des différences sur les décisions cliniques prises par les cliniciens
- L'erreur totale observée (TEo) doit être strictement inférieure à l'erreur totale acceptable (TEa), selon les critères établis par l'ASVCP (Arnold *et al.*, 2019) qui considère qu'un TEa de 20% est acceptable pour les pourcentages réticulocytaires (Nabity *et al.*, 2018)

- *Calcul de l'erreur totale observée*

Il faut d'abord calculer le coefficient de variation CV (%) avec SD l'écart-type :

$$CV (\%) = \frac{SD}{Moyenne\ des\ mesures} \times 100$$

puis, extraire l'erreur totale observée (TEo) à partir du biais, les formule sont alors :

$$bi\ a\ i\ s\ (\%) = \frac{Moyenne(r\ e\ f\ e\ r\ e\ n\ c\ e) - Moyenne(m\ e\ s\ u\ r\ e\ e)}{Moyenne\ (r\ e\ f\ e\ r\ e\ n\ c\ e)} \times 100$$

avec Moyenne(référence) la moyenne des mesures de la méthode de référence et Moyenne(mesurée) la moyenne des mesures de la méthode testée. Enfin :

$$TEo = 2 \times CV\ (en\ \%) + |B\ i\ a\ i\ s|\ (en\ \%)$$

Cette formule est utilisée pour l'objectif numéro 1.

Si, la TEa est dans une autre unité que le pourcentage, alors la TEo se calcule ainsi :

$$TEo = 2 \times SD + |B\ i\ a\ i\ s|$$

e. Objectif 2 : détermination du modèle mathématique

a. Constitution de sous-groupes d'individus

Dans cette étude, l'échantillon initial est divisé en deux sous-groupes distincts de taille égale. Cette division est réalisée de manière aléatoire, ce qui signifie qu'aucune sélection spécifique n'est effectuée lors de la constitution des sous-groupes. Les individus inclus dans chaque sous-groupe proviennent tous de l'échantillon étudié initial.

Le premier sous-groupe est utilisé pour déterminer l'expression de l'équation mathématique permettant la correction des mesures obtenues avec le SYSMEX XT-2000.

Le deuxième sous-groupe est utilisé pour vérifier et valider le modèle développé à partir du premier sous-groupe.

b. Régression linéaire multiple

Dans notre étude, la régression linéaire multiple est utilisée pour examiner la relation entre les valeurs obtenues par la méthode de comptage manuel et celles obtenues par la méthode de comptage automatisée (Della Vedova, 2021). Nous avons utilisé le logiciel de statistique XLSTAT pour effectuer cette régression (Lumivero, 2023). Nous avons utilisé pour cela la méthode « pas-à-pas », comme expliqué par Emmanuel Chazard dans son cours (*Régression linéaire multiple en pratique*, 2020). L'explication de la méthode est en annexe 2. L'utilisation de XLSTAT est en annexe 3. Plusieurs variables d'une équation sont testées à partir des variables obtenues par l'automate SYSMEX XT-2000. La régression linéaire multiple quantifie l'importance de chaque variable de l'équation pour obtenir une concordance avec les variables obtenues lors de la méthode manuelle. Ainsi, on peut supprimer au fur et à mesure les variables ayant peu d'importance pour l'obtention du résultat final et affiner le modèle.

c. Conditions à imposer concernant l'équation

Des considérations mathématiques et biologiques sont imposées afin que le modèle ne donne pas de résultats aberrants et que les résultats donnés soient cohérents. Les conditions sont :

- $\%Agrégés + \%Ponctués \leq 100\%$;
- $\%Agrégés \geq 0\%$ et $\%Ponctués \geq 0\%$;
- $\%Agrégés \leq \%Ponctués$ (l'inverse n'est pas possible biologiquement).

Si une des conditions n'est pas respectée, le modèle indique un résultat nécessitant un comptage manuel sur le frottis sanguin.

d. Outils statistiques

Les outils utilisés dans cette partie sont identiques à ceux du premier objectif. La démarche ASVCP et les critères de Bland et Altman sont identiques.

3. Résultats

a. Caractérisation de l'échantillon et des sous-groupes

- *Description épidémiologique (cf. annexe 1)*

L'échantillon décrit ci-dessous est celui utilisé pour comparer les numérations réticulocytaires calculées par le SYSMEX XT-2000 et l>IDEXX Procyte Dx.

Sur 100 individus étudiés, 85% étaient stérilisés dont 36 femelles stérilisées et 49 mâles castrés. Le reste de la population était composé de 10 femelles et 5 mâles. La classe d'âge la plus représentée était celle des animaux de 8 à 12 ans. La moins représentée était celle des animaux entre 16 ans et

20 ans. Les chats étaient en grande majorité des européens (78%), puis les Sacré Birman et les British Shorthair (4%).

Dans le sous-groupe 1, sur 50 individus étudiés, 86% étaient stérilisés dont 18 femelles stérilisées et 25 mâles castrés. Le reste de la population était composée de 4 femelles et 3 mâles. La classe d'âge la plus représentée était celle des animaux de 4 à 6 ans et celle des 14 à 16 ans. La moins représentée était celle des animaux entre 16 ans à 18 ans et celle des 2 à 4 ans. Les chats étaient en grande majorité des européens (74%), puis des British Shorthair (6%).

Dans le sous-groupe 2, sur 50 individus étudiés, 85% étaient stérilisés dont 36% de femelles stérilisées et 49% de mâles castrés. Le reste de la population était composée de 6 femelles et 2 mâles. La classe d'âge la plus représentée était celle des animaux de 8 à 12 ans. La moins représentée était celle des animaux entre 16 ans à 20 ans. Dans le sous-groupe 2, les chats étaient en grande majorité des européens (82%), puis des Sacrés Birmans (4 %).

- *Description clinique : Numération réticulocytaires des sous-groupes (n=50)*

Le Tableau 8 nous montre que les 2 sous-groupes sont semblables sur le plan de leur numération réticulocytaire peu importe la méthode de mesure choisie.

Tableau 8 - Comparaison des sous-groupes 1 et 2 (n=50) sur leur numération réticulocytaires selon les différentes méthodes utilisées

	Sous-groupe	Moyenne	Médiane	Ecart-type	Maximum	Minimum
Comptage Manuel : % Réticulocytes	1	22,3%	18,3%	17,8%	75,2 %	1,5%
	2	23,6 %	18,9%	20,3%	79,4%	0,4%
Comptage Manuel : % Agrégés	1	3,7%	1,1%	9,4%	58,2%	0%
	2	3,1%	0,9%	6,5%	43,4%	0%
Comptage Manuel : % Ponctués	1	18,7%	14,2%	15,5%	69,0%	1,4%
	2	20,5%	16,4%	17,3%	70,7%	0,4%
SYSMEX XT-2000 : % Réticulocytes	1	4,9%	1,7%	11,1%	57,1%	0,3%
	2	4,9%	2,3%	9,3%	61,8%	0,2%
SYSMEX XT-2000 : % HFR	1	0,4 %	0,06%	1,3%	6,7%	0%
	2	0,3%	0,07%	0,9%	6,4%	0%
SYSMEX XT-2000 : % MFR	1	1,1 %	0,2%	3,6%	18,6%	0,0%
	2	0,8%	0,2%	2,4%	16,8%	0,02%
SYSMEX XT-2000 : % LFR	1	3,4%	1,5%	6,3 %	32,5%	0,2%
	2	3,8%	1,9%	6,0%	38,5%	0,1%
IDEXX Procyte DX : % Réticulocytes	1	4,2 %	0,6%	14,0%	71,0%	0,07%
	2	3,4%	0,8%	9,8%	65,5%	0,08%
IDEXX Procyte DX : % HFR	1	2,0%	0,2%	7,4%	37,4%	0%
	2	1,6%	0,2%	5,5%	37,8%	0%
IDEXX Procyte DX : % MFR	1	0,6%	0,1%	1,9%	9,8%	0%
	2	0,6%	0,1%	1,6%	9,5%	0%
IDEXX Procyte DX : % LFR	1	1,5%	0,3%	4,7%	23,7%	0,0%
	2	1,2%	0,4%	2,8%	18,3%	0,02%

- *Interprétation*

Il convient de noter que les deux sous-groupes présentent des similitudes remarquables en ce qui concerne les caractéristiques cliniques et les numérations réticulocytaires. Cette constatation revêt une importance capitale pour assurer la validité des comparaisons effectuées et des résultats obtenus dans le cadre de cette étude.

b. Objectif 1

Le but de cette partie est de montrer les discordances entre les mesures par les automates et qu'elles peuvent être associées à des conséquences cliniques. Nous avons bien à minima 40 cas comme indiqué dans les recommandations ASVCP (Arnold *et al.*, 2019).

a. Coefficient de concordance de Lin concernant les différentes variables

Trois individus présentent des valeurs de réticulocytes absolues supérieures à 1 000 000 réticulocytes/uL sur les deux automates et sont donc non pris en compte lors des calculs des coefficients, car ayant trop d'influence sur ces derniers. Les coefficients de Lin sont « passables » à « bons » en fonction des variables mesurées (Tableau 9). Les mesures des deux automates de comptage ne concordent pas parfaitement, en particulier pour %HFR où le coefficient de Lin est « passable », alors que les deux automates utilisent les mêmes techniques pour mesurer les réticulocytes.

Tableau 9 - Coefficient de concordance de Lin entre les différentes variables des automates

Variable donnée par l'automate	Coefficient de Lin	Interprétation (Landis et Koch, 1977)
Nombre absolu de réticulocytes	0,67 [0,57 ; 0,74]	Bonne concordance
Pourcentage de réticulocytes	0,80 [0,72 ; 0,86]	Bonne concordance
% LFR	0,44 [0,35 ; 0,52]	Concordance moyenne
% MFR	0,75 [0,64 ; 0,83]	Bonne concordance
% HFR	0,30 [0,25 ; 0,35]	Concordance passable

b. Quantification du biais sur la mesure du nombre absolu de réticulocytes

Le graphique de Bland et Altman conformément aux recommandations de l'ASVCP est réalisé. La ligne rouge représente le biais moyen et les lignes rouges pointillées, l'intervalle de confiance à 95% de ce biais. Les lignes vertes représentent les limites d'agrément.

Le biais observé dans notre étude est de $68,5 \times 10^3$ /uL réticulocytes. Cela signifie que le SYSMEX XT-2000 surestime en moyenne de $68,5 \times 10^3$ /uL réticulocytes la valeur absolue réticulocytaire d'un échantillon. Ce biais est statistiquement significatif car l'intervalle de confiance à 95%, qui est de

[56,7 x 10³ ; 80,3 x 10³]/uL réticulocytes, ne comprend pas la valeur de zéro. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément -46,5 [-66,9 ; -26,0] /uL ; 183,5 % [163,1 %, 204,0 %]] (Figure 12).

Ces résultats indiquent que le SYSMEX XT-2000 présente une tendance systématique à surestimer la numération réticulocytaire par rapport à la méthode automatisée de référence utilisée (Figure 12).

En réalisant un Tableau à double entrée d'après la classification de Cowgill *et al.*(Cowgill *et al.*, 2003), nos résultats indiquent que le SYSMEX XT-2000 surestime significativement le nombre de réticulocytes, en particulier sur les plages de numérations réticulocytaires faibles. Cette surestimation peut entraîner une classification incorrecte des échantillons en terme du caractère régénératif ou non de l'anémie (Tableau 10). Ces résultats indiquent que la surestimation initiale de la numération réticulocytaire n'est pas sans conséquences sur le plan clinique et pronostique concernant le classement de l'anémie.

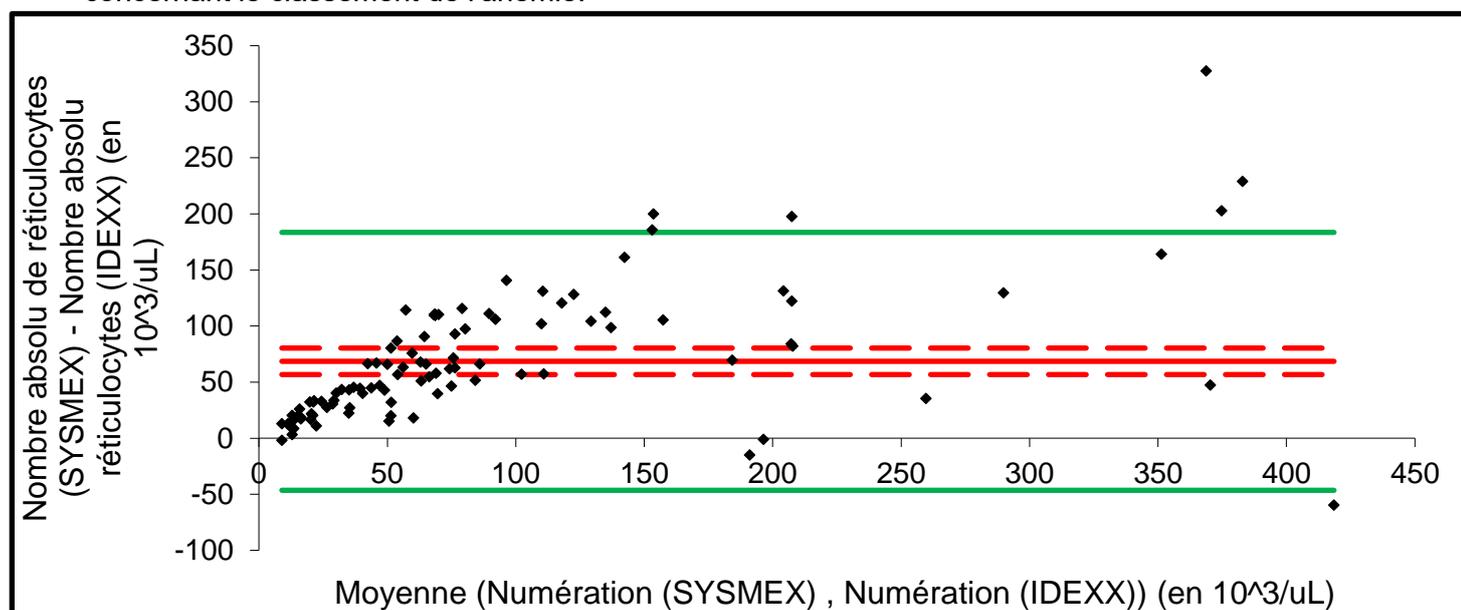


Figure 12 - Graphique de Bland et Altman entre la numération réticulocytaire absolue obtenue par le IDEXX Procyte DX et par le SYSMEX XT-2000

Tableau 10 - Comptage absolu de réticulocytes donné par le SYSMEX XT-2000 en fonction de celui donné par le IDEXX Procyte Dx

		Procyte Dx (en /uL)				
		< 42 000	42 000 - 70 000	70 000 - 100 000	> 100 000	Total
Sysmex (en /uL)	< 42 000	20				20
	42 000 - 70 000	13	2			15
	70 000 - 100 000	15	2			17
	> 100 000	12	11	5	20	48
Total		60	15	5	20	100

Pour chaque individu, on observe dans quelle catégorie le SYSMEX XT-2000 a placé l'échantillon en fonction de la classification donnée par l'IDEXX Procyte DX.

c. Quantification du biais sur la mesure du pourcentage de réticulocytes

Le graphique de Bland et Altman conformément aux recommandations de l'ASVCP est réalisé.

La ligne rouge représente le biais moyen et les lignes rouges pointillées, l'intervalle de confiance à 95% de ce biais. Les lignes vertes représentent les limites d'agrément.

Le pourcentage de réticulocytes déterminé par le SYSMEX XT-2000 est systématiquement surestimé de 1,44 % par rapport à l'IDEXX Procyte DX. Ce biais systématique est statistiquement significatif car l'intervalle de confiance à 95% [1,07% ; 1,80%] ne contient pas la valeur 0. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-2,0% [-2,7% ; -1,4%] ; 4,9% [4,3%,5,6%]] (Figure 13). Les deux critères de Bland et Altman sont donc validés.

Ces résultats indiquent que le SYSMEX XT-2000 présente une tendance systématique à surestimer le pourcentage de réticulocytes par rapport à la méthode automatisée de référence utilisée.

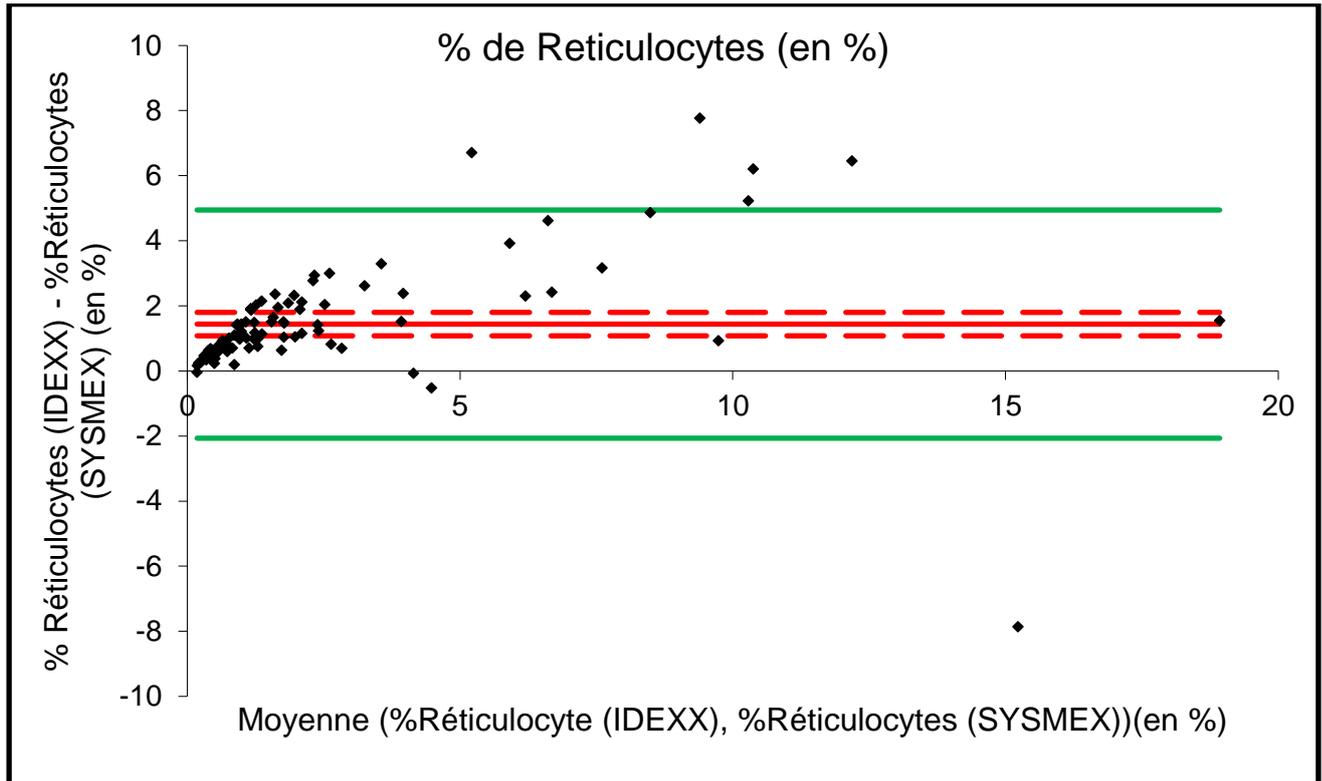


Figure 13 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de réticulocytes obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000

d. Quantification du biais sur la mesure du pourcentage LFR relatif, MFR relatif et HFR relatif

Les graphiques de Bland et Altman conformément aux recommandations de l'ASVCP sont réalisés. La ligne rouge représente le biais moyen et les lignes rouges pointillées, l'intervalle de confiance à 95% de ce biais. Les lignes vertes représentent les limites d'agrément.

On observe que :

- Le SYSMEX XT-2000 surestime en moyenne de 1,9% la valeur de LFR (Low Fluorescence Reticulocytes) par rapport à l>IDEXX Procyte Dx d'un individu et que ce biais est significatif car l'intervalle de confiance à 95% [1,4% ; 2,3%] ne contient pas la valeur 0 (Figure 14). Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-1,9% [-2,6% ; -1,2%] ; 5,7% [5,0% ; 6,4%]]. Les deux critères de Bland et Altman sont donc validés.
- Le SYSMEX XT-2000 surestime en moyenne de 0,11% la valeur de MFR (Medium Fluorescence Reticulocytes) par rapport à l>IDEXX Procyte Dx d'un individu et ce biais est significatif car l'intervalle de confiance à 95% [0,02% ; 0,21%] ne contient pas la valeur 0 (Figure 15). Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-0,8 % [-1,0% ; -0,7%] ; 1,0% [0,8%, 1,2%]]. Les deux critères de Bland et Altman sont donc validés.
- Le SYSMEX XT-2000 sous-estime en moyenne de 0,56% la valeur d'HFR (High Fluorescence Reticulocytes) par rapport à l>IDEXX Procyte Dx d'un individu et ce biais est significatif car l'intervalle de confiance à 95% [0,31% ; 0,81%] ne contient pas la valeur 0 (Figure 16). Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-3,0% [-3,4% ; -2,6%] ; 2,0% [1,4 % , 2,6%]]. Les deux critères de Bland et Altman sont donc validés.

Ces résultats indiquent que le SYSMEX XT-2000 présente une tendance systématique à surestimer le pourcentage de LFR et de MFR et une tendance systématique à sous-estimer le pourcentage de HFR par rapport à la méthode automatisée de référence utilisée.

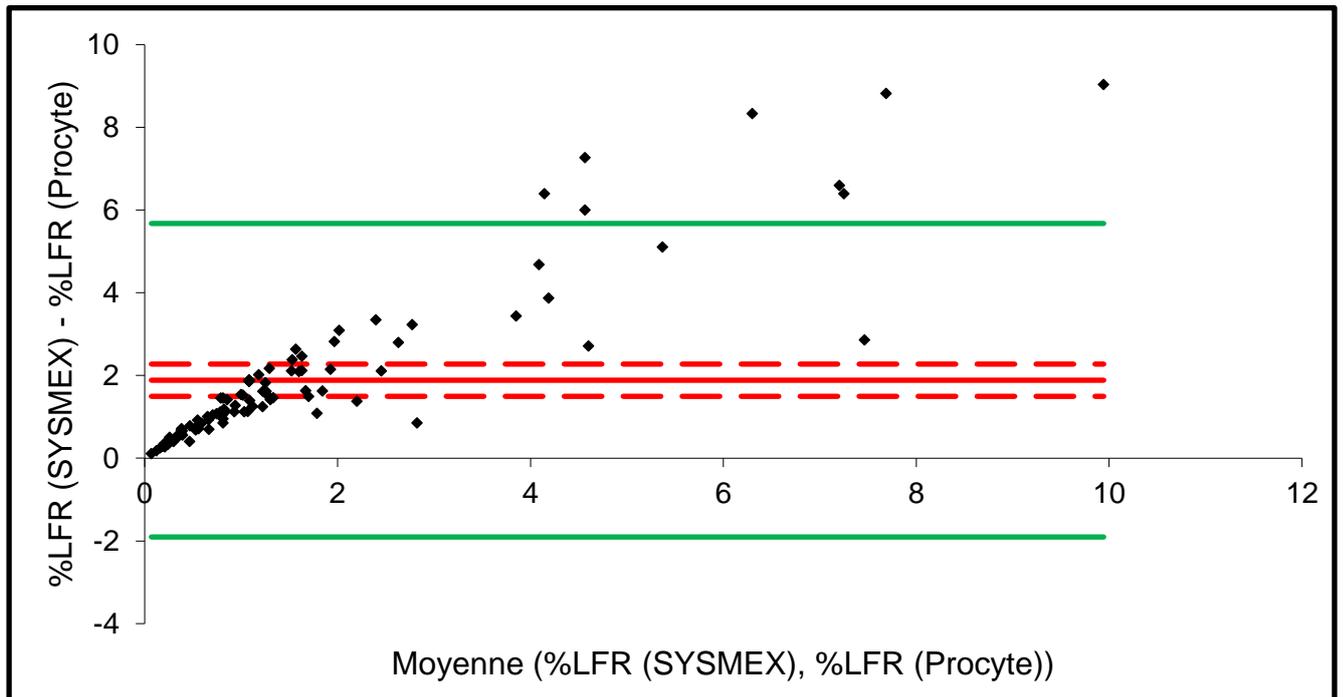


Figure 14 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de LFR obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000

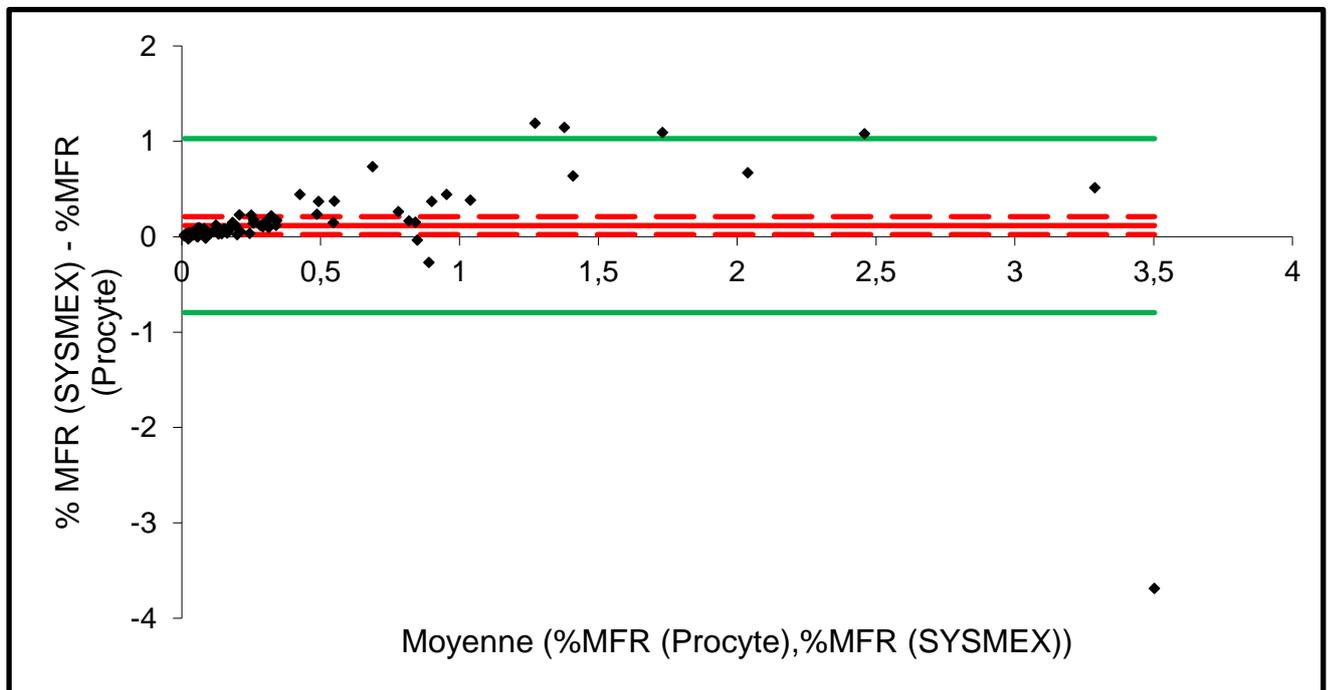


Figure 15 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de MFR obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000

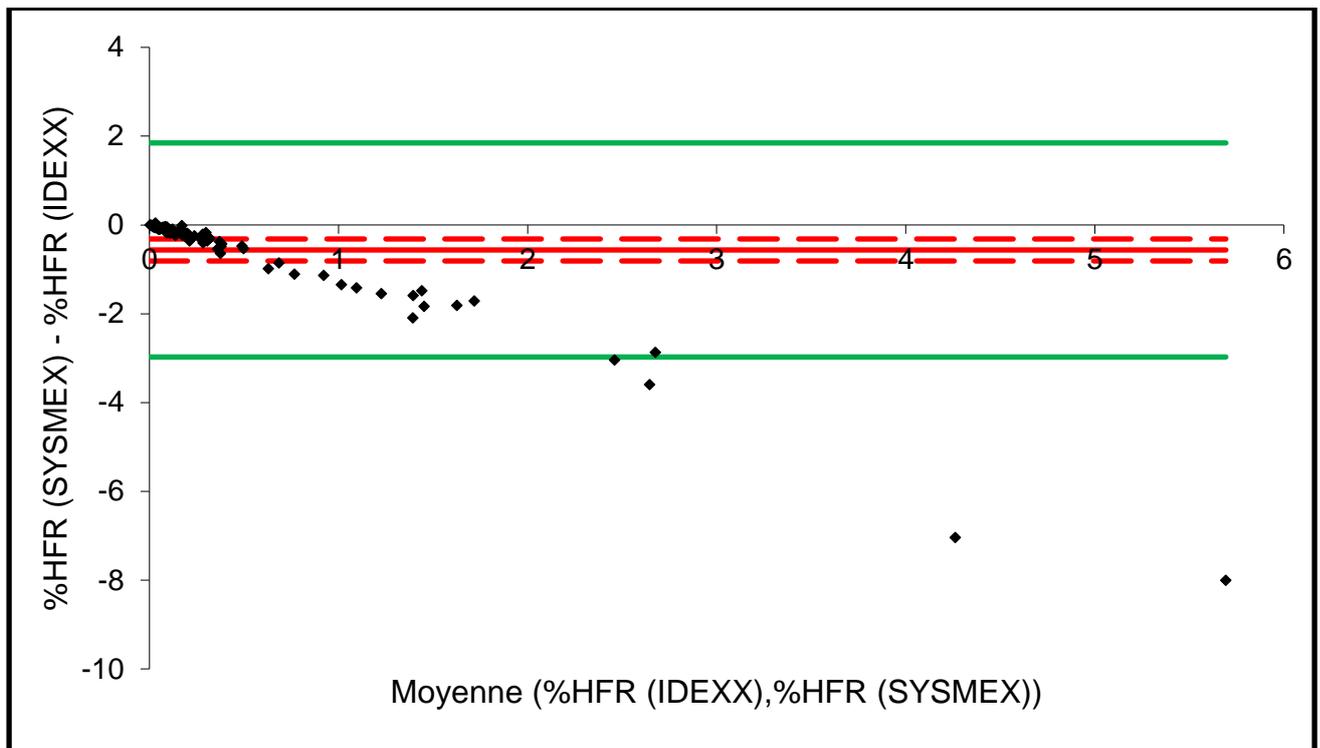


Figure 16 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de HFR obtenue par le IDEXX Procyte Dx et par le SYSMEX XT-2000

e. Calcul des Coefficients de variabilités et des Total error observed (TEo)

Aucune TEo n'est inférieure à la Total Allowable error (TEa), la dernière partie de la démarche d'après l'ASVCP n'est donc pas validée concernant le SYSMEX XT-2000 (Tableau 13).

Tableau 11 - Coefficients de variabilité en fonction du type de réticulocytes et du taux de réticulocytes par l'automate SYSMEX XT-2000

	% LFR	% MFR	%HFR	% Réticulocytes
CV taux faible	21,1 %	48,8 %	105,5 %	19,0 %
CV taux moyen	19,4 %	29,9 %	43,4 %	18,0 %
CV taux fort	4,5 %	19,9 %	48,1 %	4,9 %

Tableau 12 - Biais en fonction des variables données par le SYSMEX XT-2000

	%LFR	%MFR	%HFR	%Réticulocytes
Biais	-260,0 %	-37,0 %	77,3 %	- 81,3 %

Tableau 13 - TEobs en fonction du type de réticulocytes et du taux de réticulocytes par l'automate SYSMEX XT-2000

	% LFR	% MFR	%HFR	% Réticulocytes
TEo taux faible	302,4 %	134,6 %	288,3 %	119,3 %
TEo taux moyen	298,8 %	96,8 %	164,1 %	117,3 %
TEo taux fort	269,0 %	76,8 %	173,5 %	90,8 %

f. Conclusions sur les premiers résultats

Des résultats présentés jusque-là nous pouvons tirer plusieurs conclusions :

- **La numération absolue des réticulocytes** : Le SYSMEX XT-2000 **surestime de manière significative** la numération absolue des réticulocytes par rapport au IDEXX Procyte Dx. Cela signifie que le SYSMEX fournit des valeurs plus élevées que le IDEXX Procyte Dx lorsqu'il s'agit de quantifier le nombre total de réticulocytes dans un échantillon.
- **Pourcentage de réticulocytes** : Le SYSMEX XT-2000 **surestime de manière significative** le pourcentage de réticulocytes par rapport au IDEXX Procyte Dx. Cela signifie que le SYSMEX 2000iV fournit des valeurs plus élevées que le IDEXX Procyte Dx lorsqu'il s'agit de calculer la proportion de réticulocytes par rapport à l'ensemble des cellules sanguines.
- **Pourcentage de LFR** : Le SYSMEX XT-2000 **surestime de manière significative** le pourcentage de LFR par rapport au IDEXX Procyte Dx. Cela signifie que le SYSMEX fournit des valeurs plus élevées que le IDEXX Procyte Dx lorsqu'il s'agit d'estimer la proportion de réticulocytes présentant une faible fluorescence.
- **Pourcentage de MFR** : Le SYSMEX XT-2000 **surestime de manière significative** le pourcentage de MFR par rapport au IDEXX Procyte Dx. Cela signifie que le SYSMEX fournit des valeurs plus élevées que le IDEXX Procyte Dx lorsqu'il s'agit d'estimer la proportion de réticulocytes présentant une fluorescence moyenne.
- **Pourcentage de HFR** : Le SYSMEX XT-2000 **sous-estime de manière significative** le pourcentage de HFR par rapport au IDEXX Procyte Dx. Cela signifie que le SYSMEX fournit des valeurs plus faibles que le IDEXX Procyte Dx lorsqu'il s'agit d'estimer la proportion de réticulocytes présentant une haute fluorescence.

De plus, les concordances entre le SYSMEX XT-2000 et l'IDEXX Procyte DX sont « bonnes » à « passables » pour certaines variables.

Les critères de Bland et Altman sont validés pour l'ensemble des variables données en pourcentage par les automates.

La dernière partie de la démarche selon l'ASVCP ne permet pas de valider le SYSMEX XT-2000 car les TEo sont supérieures à la TEa.

Pour finir, **le SYSMEX XT-2000 ne peut pas être utilisé pour obtenir des numérations réticulocytaires correctes.**

Sur la base de ces résultats, on peut supposer que le SYSMEX XT-2000 détecte moins efficacement les réticulocytes présentant des niveaux de fluorescence élevés par rapport à l'IDEXX Procyte Dx.

Il est intéressant de constater que les coefficients de variation (CV) obtenus dans notre étude sont similaires à ceux rapportés par l'équipe de Weissenbacher (Weissenbacher, 2009). Une observation importante est que le CV diminue quand le taux de réticulocytes augmente sur le SYSMEX XT-2000. Cela suggère qu'il peut y avoir un effet de "bras de levier" plus prononcé des artefacts sur les taux faibles de réticulocytes par rapport aux taux élevés. En effet, si l'on considère qu'il y a autant d'artefact de mesures à taux faible de réticulocytes qu'à taux fort, on comprend alors que l'importance de ces artefacts est diminuée lorsque l'automate mesure des taux importants de réticulocytes.

c. Objectif 2

a. Obtention du modèle

La méthode « pas-à-pas » comme expliquée auparavant est appliquée. Quatre individus sont éliminés en raison d'une distance de Cook (Cook, 1977) trop importante. On remarque ainsi que ces individus présentent une influence significative sur les résultats du modèle de régression linéaire multiple, et leur exclusion garantit la robustesse et la validité des résultats obtenus.

- $\%Agrégés = f(HFR, MFR, LFR)$

On obtient l'équation suivante :

$$\%Agrégés = 0,36 + 10,35 \times HFR + 107,70 \times HFR^2 - 23,55 \times MFR^2 + 11,16 \times LFR \times MFR - 24,25 \times HFR \times LFR$$

Cette équation est associée à un coefficient de régression $R^2 = 0,62$. Cela signifie que 62% de la variation de la variable %Agrégés peut être expliquée par les variables indépendantes HFR, MFR et LFR incluses dans le modèle.

- $\%Ponctués = f(HFR, MFR, LFR)$

On obtient l'équation suivante :

$$\%Ponctués = 22,97 + 373,03 \times HFR + 1602,07 \times HFR^2 - 135,97 \times HFR^3 - 108,06 \times MFR - 218,27 \times MFR^2 + 31,36 \times MFR^3 - 16,46 \times LFR + 9,62 \times LFR^2 - 0,19 \times LFR^3 + 101,78 \times LFR \times MFR - 370,4 \times HFR \times LFR$$

Cette équation est associée à un coefficient de régression $R^2 = 0,35$. Cela signifie que 35% de la variation de la variable %Ponctués peut être expliquée par les variables indépendantes utilisées dans le modèle.

b. Coefficients de Lin pour les différentes variables du modèle

Les coefficients de Lin sont « mauvais » à « moyens » en fonction des variables mesurées (Tableau 14) entre le comptage manuel et le comptage par le modèle mathématique ajusté.

Tableau 14 - Coefficient de concordance de Lin entre les différentes variables données par le modèle mathématique et par le comptage manuel

Variable donnée par l'automate	Coefficient de Lin	Interprétation (d'après (Landis et Koch, 1977))
Pourcentage de réticulocytes	0,27 [- 0,02 ; 0,52]	Concordance passable
Pourcentage de réticulocytes agrégés	0,55 [0,31 ; 0,72]	Concordance moyenne
Pourcentage de réticulocytes ponctués	0,12 [- 0,12 ; 0,46]	Concordance mauvaise

c. Concordance du modèle avec la méthode manuelle

Le modèle est appliqué sur les termes obtenus par le SYSMEX XT-2000 pour les individus du sous-groupe 2. Pour 7 individus de ce sous-groupe, le modèle appliqué donne des résultats qui ne respectent pas les conditions imposées en matériels et méthodes sur les résultats de l'équation.

Le graphique de Bland et Altman conformément aux recommandations de l'ASVCP est réalisé.

La ligne rouge représente le biais moyen et les lignes rouges pointillées, l'intervalle de confiance à 95% de ce biais. Les lignes vertes représentent les limites d'agrément.

Le pourcentage de réticulocytes agrégés déterminé par le modèle est systématiquement surestimé de 0,35 % par rapport au comptage manuel. Ce biais systématique est statistiquement non significatif car l'intervalle de confiance à 95% [-0,07 % ; 0,78 %] inclut la valeur de zéro. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-3,8 % [- 4,5 % ; - 3,0%] ; 4,5% [3,8%, 5,2%]]. Les deux critères de Bland et Altman sont donc validés (Figure 17).

Le pourcentage de réticulocytes ponctués déterminé par le modèle est systématiquement surestimé de 2,6 % par rapport au comptage manuel. Ce biais systématique est statistiquement non significatif car l'intervalle de confiance à 95% [-1,2 % ; 6,4 %] inclut la valeur de zéro. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-35,4 % [- 42,0 % ; - 28,7%] ; 40,5% [33,8%, 47,2%]]. Le deuxième critère de Bland et Altman n'est donc pas validé (Figure 18).

Le pourcentage de réticulocytes total déterminé par le modèle est systématiquement surestimé de 3,0 % par rapport au comptage manuel. Ce biais systématique est statistiquement non significatif car l'intervalle de confiance à 95% [-1,1 % ; 7,0 %] inclut la valeur de zéro. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-37,1 % [- 44,2 % ; - 30,2%] ; 43,0% [39,9%, 50,0%]]. Le deuxième critère de Bland et Altman n'est donc pas validé (Figure 19).

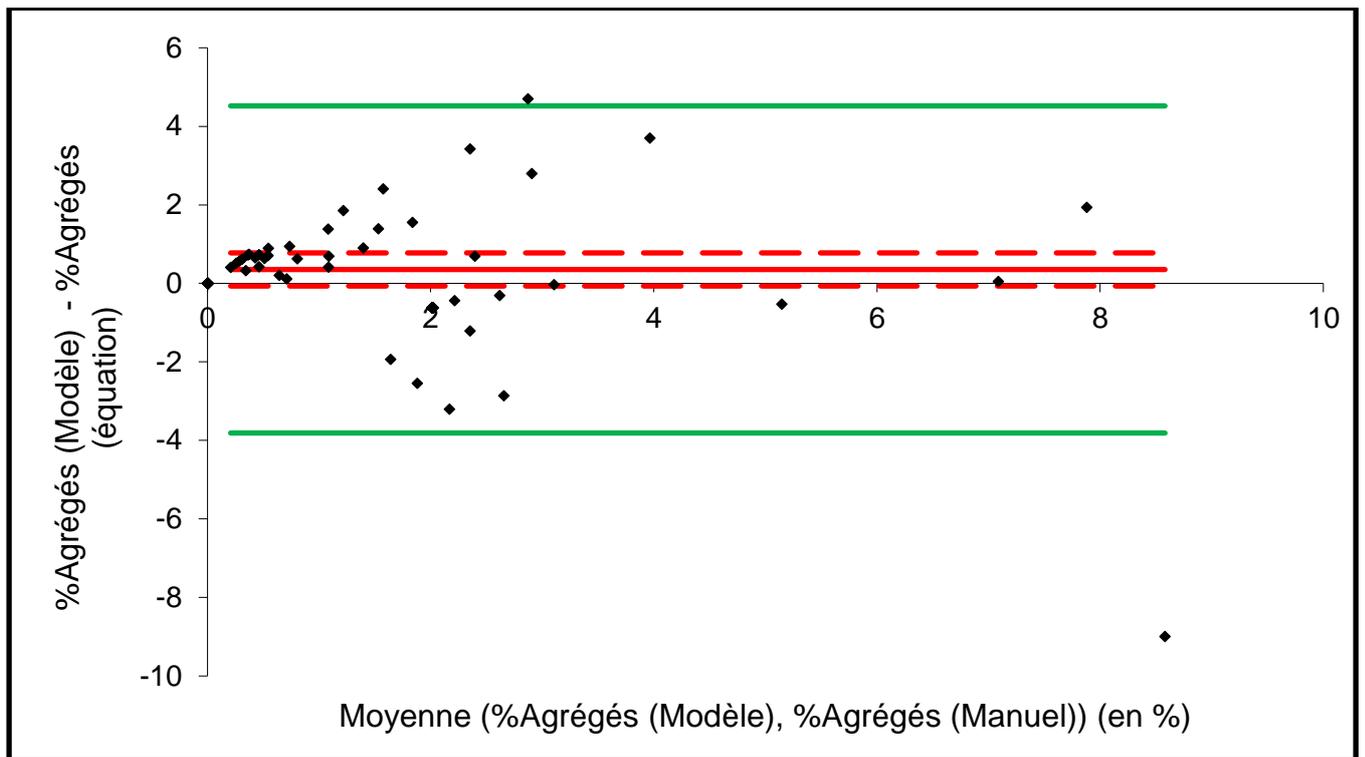


Figure 17 - Graphique de Bland et Altman entre le taux en réticulocytes agrégés obtenu par le comptage manuel et par le modèle mathématique

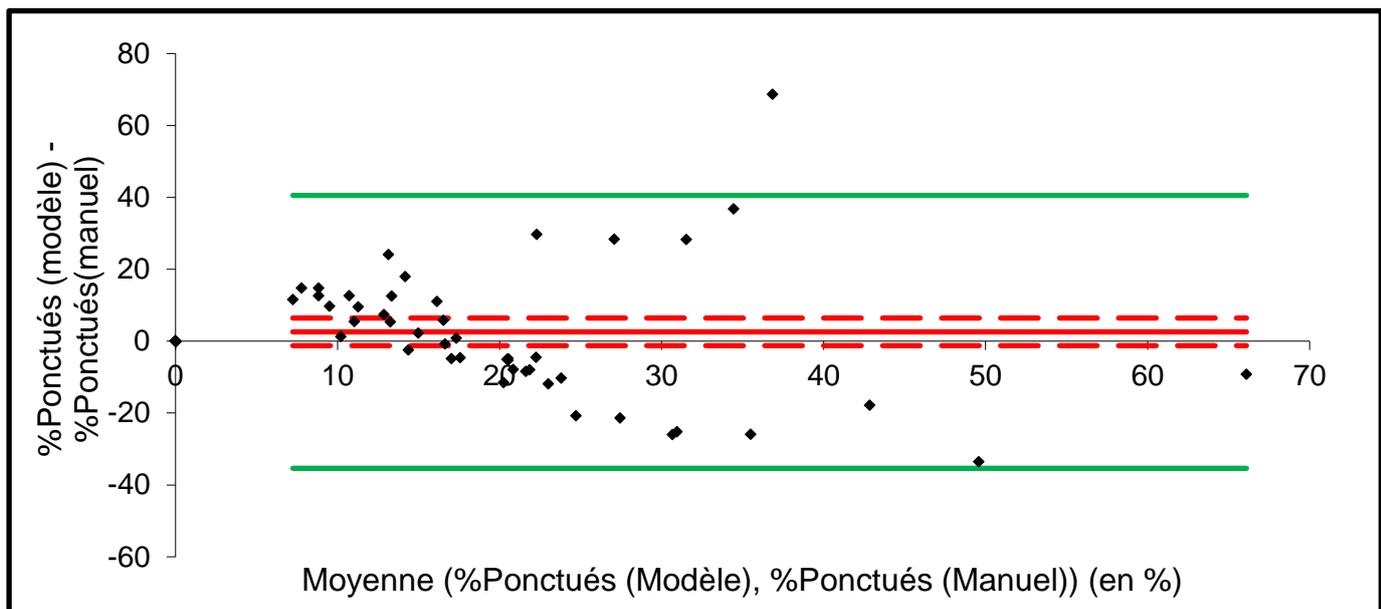


Figure 18 - Graphique de Bland et Altman entre le taux en réticulocytes ponctués obtenu par le comptage manuel et par le modèle mathématique

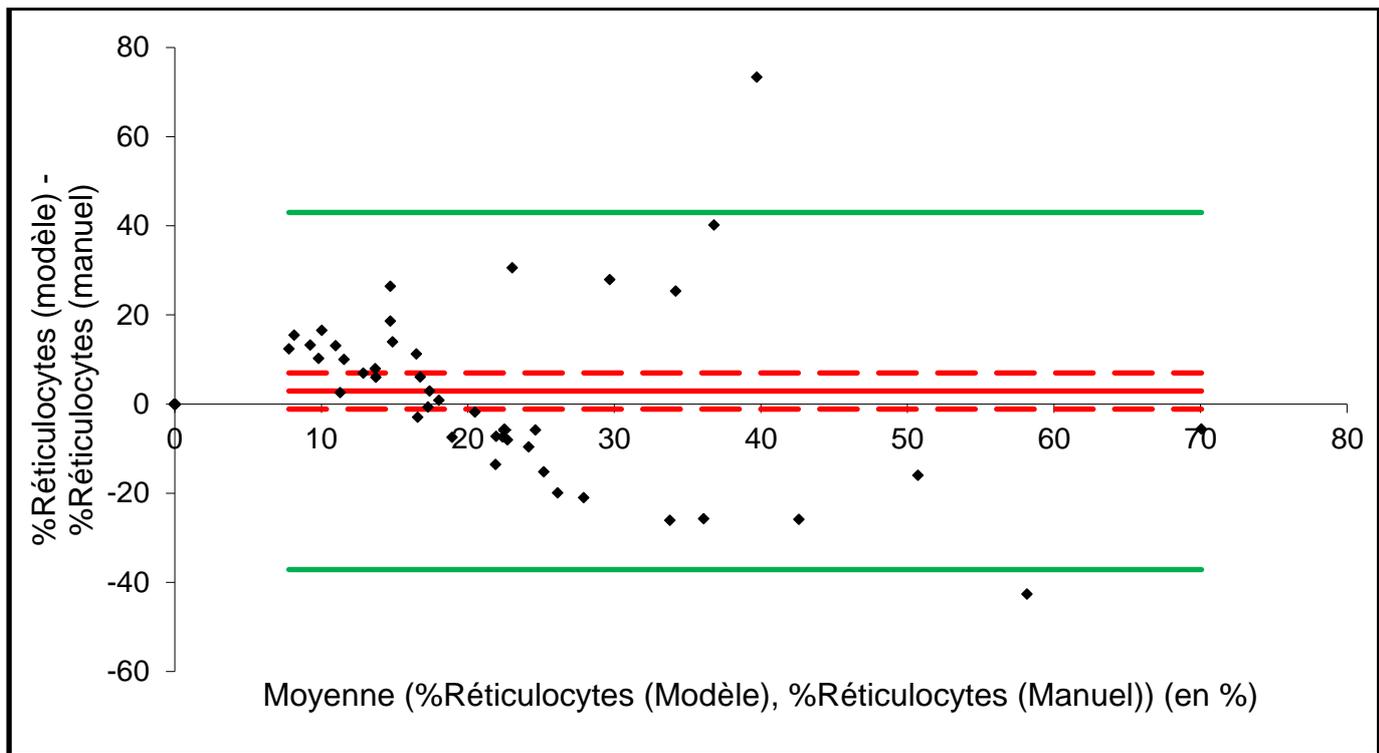


Figure 19 - Graphique de Bland et Altman entre le taux en réticulocytes total obtenu par le comptage manuel et par le modèle mathématique

d. TEO du modèle

Tout d'abord, il est intéressant de noter que le coefficient de variation (Tableau 15) est plus faible pour un taux total de réticulocytes important, ce qui suggère une meilleure reproductibilité dans ce cas. De plus, il semble que le coefficient de variation soit également plus faible pour des réticulocytoses importantes. On peut attribuer cette observation au grand nombre de réticulocytes observés, permettant une meilleure observation de ces derniers.

Aucune TEO n'est inférieure à la TEa, la dernière partie de la démarche d'après l'ASVCP n'est donc pas validée concernant le modèle mathématique (Tableau 16) :

Tableau 15 - Biais en fonction des variables données par le modèle mathématique

	%Agrégés	%Ponctués	% Réticulocytes
Biais	-20,3 %	- 12,9 %	- 13,5 %

Tableau 16- Coefficient de variation du modèle en fonction du taux de réticulocytes

	% Agrégés	% Ponctués	% Réticulocytes
CV taux faible	13,3 %	17,0 %	13,0 %
CV taux moyen	6,9 %	8,6 %	8,4 %
CV taux fort	24,2 %	12,3 %	12,7 %

Tableau 17 - TEo des variables données par le modèle

	% Agrégés	% Ponctués	% Réticulocytes
TEo taux faible	46,9 %	46,9 %	39,5 %
TEo taux moyen	34,1 %	30,1 %	30,3 %
TEo taux fort	68,7 %	37,5 %	38,9 %

4. Analyse des résultats

a. Analyse du modèle

Afin d'explorer les domaines de définition où le modèle donne des résultats ne respectant pas les conditions de sortie de l'équation, le modèle est analysé au niveau de ces termes et les variations du modèle sont étudiées.

- *Termes de l'équation*

Il est important de noter que la présence de termes négatifs dans l'équation peut indiquer que certaines combinaisons spécifiques de valeurs des variables indépendantes conduisent à une prédiction de %Agrégés inférieure à zéro. La même observation est réalisable concernant %Ponctués donné par l'équation.

On peut alors conclure qu'il existe des valeurs pour lesquelles le modèle renvoie des résultats négatifs, et donc rejetés.

- *Variations de l'équation*

Afin d'observer les variations du modèle selon une variable spécifique, on fixe la valeur des autres variables à leur médiane dans le sous-groupe 1 (Tableau 17). On estime que le modèle varie de manière « cohérente » si les variations de % Agrégés coïncident avec les variations de % HFR (car les HFR correspondent aux réticulocytes ayant le plus de matériel nucléaire, les réticulocytes agrégés) et si les variations de % Ponctués coïncident avec les variations de % LFR (car les LFR correspondent aux réticulocytes ayant le moins de matériel nucléaire, les réticulocytes ponctués).

Tableau 18 - Médiane des pourcentages obtenus avec l'automate SYSMEX XT-2000 du sous-groupe 1

	LFR (en %)	MFR (en %)	HFR (en %)
Médiane	1,49 %	0,16 %	0,06 %

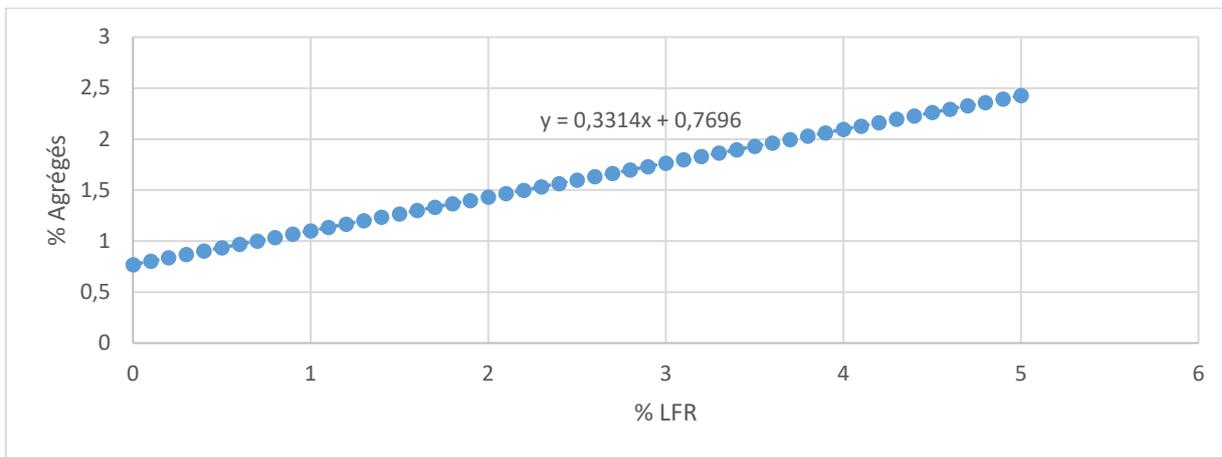
Ces médianes seront utilisées lorsque l'on fait varier un des termes de l'équation, la valeur des autres variables est alors leur médiane

On observe que :

- Les variations les moins significatives de %Agrégés sont observées avec le pourcentage de LFR (Figure 20). Les réticulocytes LFR, présentent une fluorescence moins élevée car ils possèdent une plus faible quantité de matériel nucléaire, tout

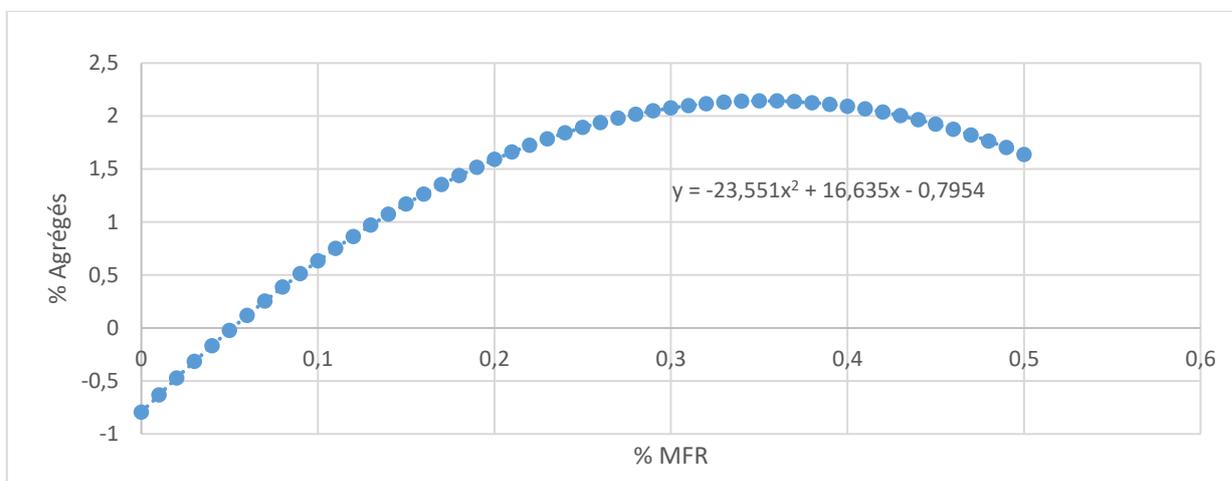
comme les réticulocytes ponctués. Par conséquent, le modèle appliqué est cohérent avec ces caractéristiques des réticulocytes agrégés.

- Les variations de %Agrégés peuvent être négatives en faisant varier %MFR (Figure 21). Ces derniers présentent une fluorescence intermédiaire. Cette observation n'est pas cohérente avec les caractéristiques des réticulocytes.
- Les variations les plus significatives de %Agrégés sont observées avec le pourcentage de HFR (Figure 22). Les réticulocytes HFR, présentent une fluorescence plus élevée car ils possèdent une plus grande quantité de matériel nucléaire, tout comme les réticulocytes agrégés. Par conséquent, le modèle appliqué est cohérent avec ces caractéristiques des réticulocytes agrégés.
- Les variations les moins significatives de %Ponctués sont observées avec le pourcentage de LFR (Figure 23). Les réticulocytes LFR, présentent une fluorescence moins élevée car ils possèdent une plus faible quantité de matériel nucléaire, tout comme les réticulocytes ponctués. Par conséquent, le modèle appliqué n'est pas cohérent avec ces caractéristiques des réticulocytes ponctués.
- Les variations de %Ponctués peuvent être négatives en faisant varier %MFR (Figure 24). Ces derniers présentent une fluorescence intermédiaire. Cette observation n'est pas cohérente avec les caractéristiques des réticulocytes.
- Les variations les plus significatives de %Ponctués sont observées avec le pourcentage de HFR (Figure 25). Les réticulocytes HFR, présentent une fluorescence plus élevée car ils possèdent une plus grande quantité de matériel nucléaire, tout comme les réticulocytes agrégés. Par conséquent, le modèle appliqué n'est pas cohérent avec ces caractéristiques des réticulocytes ponctués.



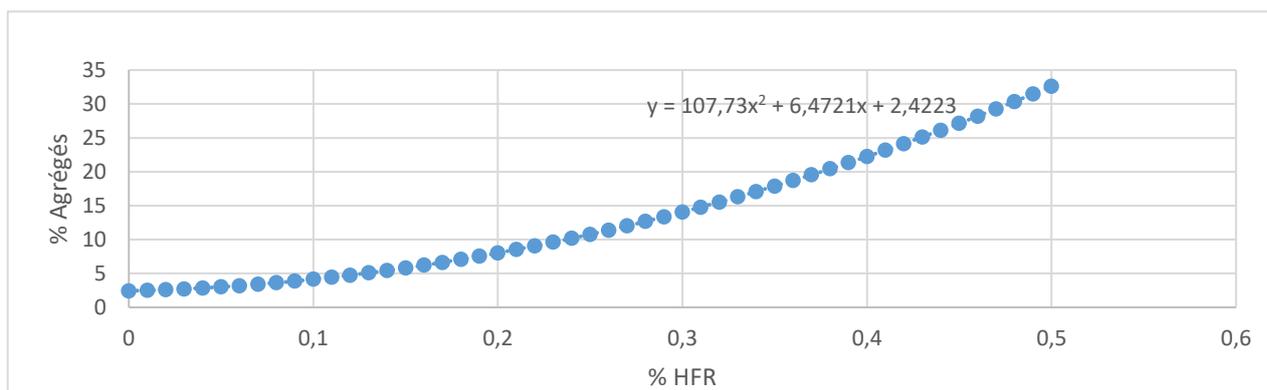
On fixe %MFR et %HFR à leur médiane pour obtenir les variations de % Agrégés = f (%LFR)

Figure 20 - Pourcentage d'agrégés en fonction du taux de LFR à taux de MFR et taux de HFR fixe



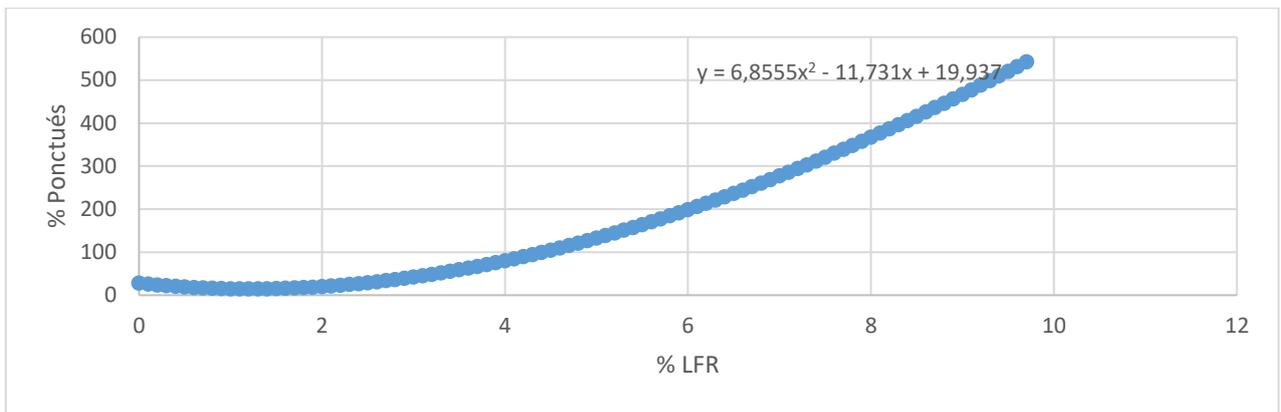
On fixe %LFR et %HFR à leur médiane pour obtenir les variations de % Agrégés = f (%MFR)

Figure 21 - Pourcentage d'agrégés en fonction du taux de MFR à taux de LFR et taux de HFR fixe



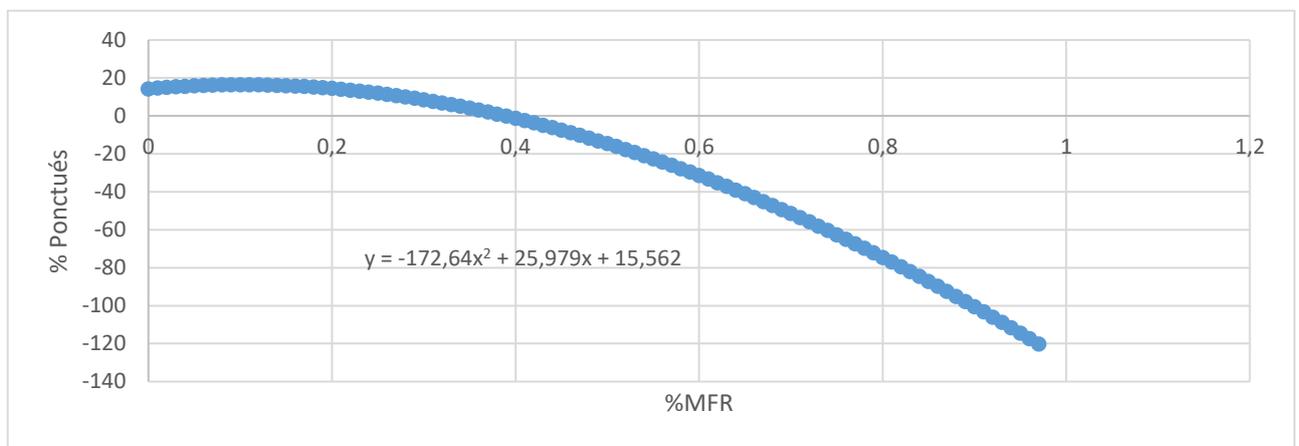
On fixe %LFR et %MFR à leur médiane pour obtenir les variations de % Agrégés = f (%HFR)

Figure 22 - Pourcentage d'agrégés en fonction du taux de HFR à taux de LFR et taux de MFR fixe



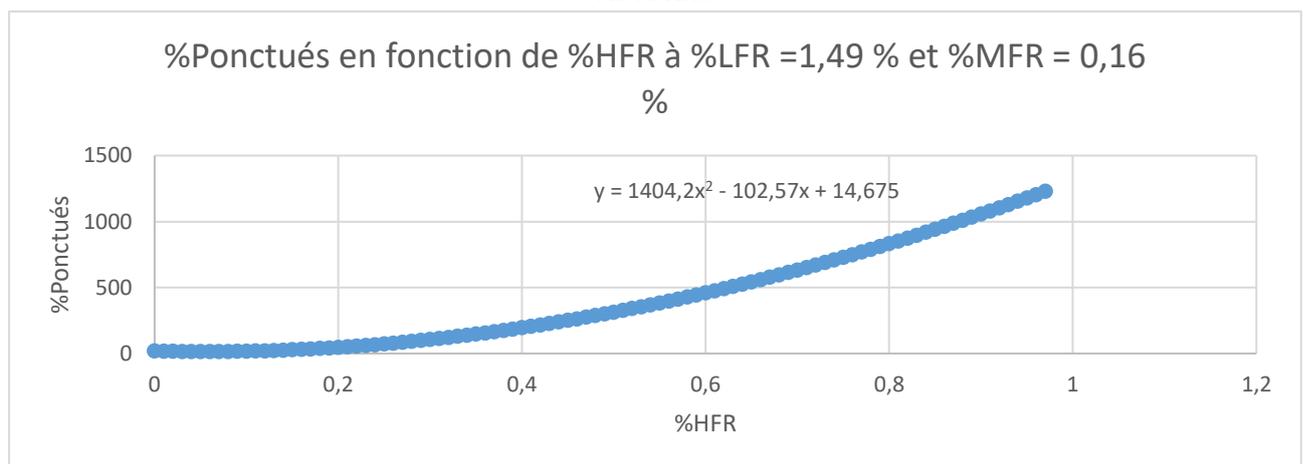
On fixe %MFR et %HFR à leur médiane pour obtenir les variations de % Ponctués = f (%LFR)

Figure 23 - Pourcentage de ponctués en fonction du taux de LFR à taux de MFR et taux de HFR fixe



On fixe %LFR et %HFR à leur médiane pour obtenir les variations de % Ponctués = f (%MFR)

Figure 24 - Pourcentage de ponctués en fonction du taux de MFR à taux de LFR et taux de HFR fixe



On fixe %LFR et %MFR à leur médiane pour obtenir les variations de % Ponctués = f (%HFR)

Figure 25 - Pourcentage de ponctués en fonction du taux de HFR à taux de LFR et taux de MFR fixe

- *Utilité de la constante*

Les deux équations du modèle présentent une constante qui semble avoir une faible pertinence sur le plan biologique. En effet, lorsque les valeurs de HFR, MFR et LFR sont toutes égales à zéro, cela correspond à l'absence de réticulocytes. Par conséquent, la présence de cette constante n'est pas cohérente d'un point de vue biologique. En l'éliminant, nous parvenons à une formulation plus appropriée et en accord avec les considérations biologiques. Ainsi, le modèle ajusté est présenté comme suit :

- $\%Agrégés = 10,35 \times HFR + 107,70 \times HFR^2 - 23,55 \times MFR^2 + 11,16 \times LFR \times MFR - 24,25 \times HFR \times LFR$
- $\%Ponctués = 373,03 \times HFR + 1602,07 \times HFR^2 - 135,97 \times HFR^3 - 108,06 \times MFR - 218,27 \times MFR^2 + 31,36 \times MFR^3 - 16,46 \times LFR + 9,62 \times LFR^2 - 0,19 \times LFR^3 + 101,78 \times LFR \times MFR - 370,45 \times HFR \times LFR$

- *Vérification de la validité du « modèle ajusté »*

Afin de vérifier que le modèle est toujours valide, la même démarche que précédemment est appliquée.

Le graphique de Bland et Altman conformément aux recommandations de l'ASVCP est réalisé. La ligne rouge représente le biais moyen et les lignes rouge pointillées, l'intervalle de confiance à 95% de ce biais. Les lignes vertes représentent les limites d'agrément.

Le pourcentage de réticulocytes agrégés déterminé par le modèle ajusté est systématiquement sous-estimé de 0,1 % par rapport au comptage manuel. Ce biais systématique est statistiquement non significatif car l'intervalle de confiance à 95% [-0,6 % ; 0,3 %] inclut la valeur de zéro. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [-4,4 % [- 5,2 % ; - 3,6 %] ; 4,2 % [3,4 %, 5,0 %]]. Les deux critères de Bland et Altman sont donc validés (Figure 26).

Le même graphique pour %Ponctués n'a pas été tracé car seulement 12 individus respectaient les conditions de sorties du modèle avec la nouvelle équation, montrant ainsi que la constante est nécessaire dans le modèle pour %Ponctués même si elle n'a pas de sens sur le plan biologique.

Le pourcentage de réticulocytes total déterminé par le modèle ajusté est systématiquement surestimé de 2,6 % par rapport au comptage manuel. Ce biais systématique est statistiquement non significatif car l'intervalle de confiance à 95% [-1,5 % ; 6,7 %] inclut la valeur de zéro. Par ailleurs, 95% des valeurs sont dans les limites d'agrément [- 37,5 % [- 44,5 % ; - 30,5 %] ; 42,6 % [35,6 % , 49,7 %]]. Le deuxième critère de Bland et Altman n'est donc pas validé (Figure 27).

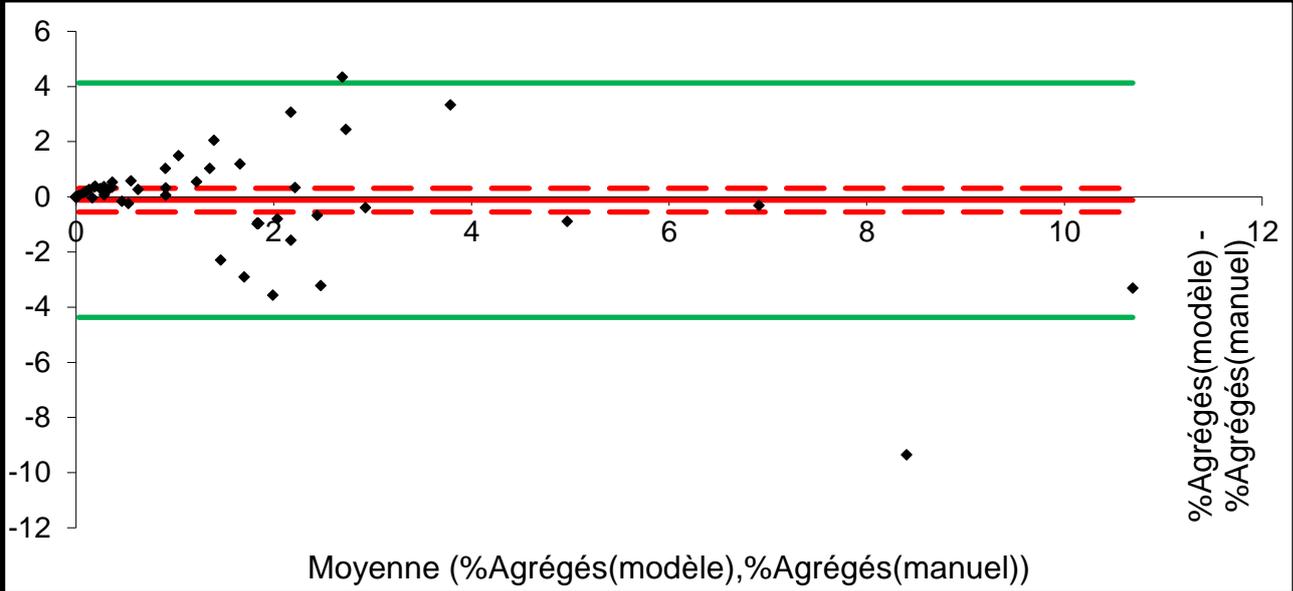


Figure 26 - Graphique de Bland et Altman entre le taux d'agrégés obtenu par l'équation et le taux d'agrégés obtenu par comptage manuel

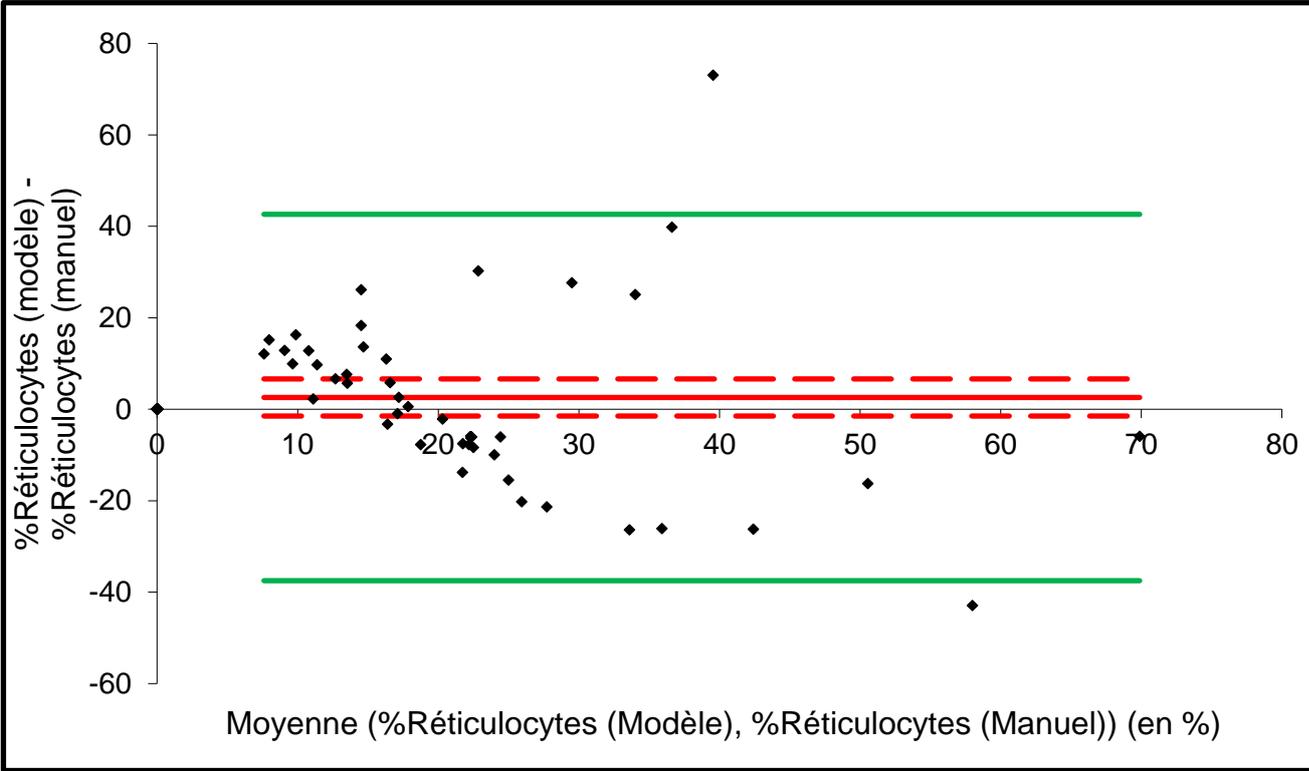


Figure 27 - Graphique de Bland et Altman entre le taux de réticulocytes total obtenu par l'équation et le taux de réticulocytes total obtenu par comptage manuel

- *Coefficients de Lin pour les différentes variables du modèle ajusté*

Les coefficients de Lin sont « mauvais » à « bons » en fonction des variables mesurées (Tableau 19) entre le comptage manuel et le comptage par le modèle mathématique ajusté. Le modèle ajusté permet donc d'avoir une meilleure concordance concernant la variable du pourcentage de réticulocytes agrégés.

Tableau 19 - Coefficient de concordance de Lin entre les différentes variables des automates

Variable donnée par l'automate	Coefficient de Lin	Interprétation (Landis et Koch, 1977)
Pourcentage de réticulocytes	0,27 [- 0,02 ; 0,52]	Concordance passable
Pourcentage de réticulocytes agrégés	0,62 [0,42 ; 0,76]	Bonne concordance
Pourcentage de réticulocytes ponctués	0,12 [- 0,12 ; 0,46]	Concordance mauvaise

- *Calcul des TEO du modèle ajusté*

On observe que les biais sont moindres pour %Agrégés et pour le %Réticulocytes avec le modèle ajusté (Tableau 20). Néanmoins, les TEO ne sont pas inférieures à la TEa (Tableau 22), la dernière étape de la démarche de l'ASCVp n'est donc pas validée. Le modèle mathématique n'est pas validé.

Tableau 20 - Biais en fonction des variables données par le modèle mathématique ajusté

	%Agrégés	%Ponctués	% Réticulocytes
Biais	6,4 %	- 12,9 %	- 11,8 %

Tableau 21- Coefficient de variabilité du modèle mathématique ajusté en fonction du taux de réticulocytes

	% Agrégés	% Ponctués	% Réticulocytes
CV taux faible	38,3 %	14,0 %	13,3 %
CV taux moyen	36,4 %	8,6 %	8,5 %
CV taux fort	26,5 %	12,3 %	12,7 %

Tableau 22 - TEO des variables données par le modèle mathématique ajusté

	% Agrégés	% Ponctués	% Réticulocytes
TEo taux faible	83 %	46,9 %	38,4 %
TEo taux moyen	79,2 %	30,1 %	28,8 %
TEo taux fort	59,4 %	37,5 %	37,2 %

- *Classement des anémies par l'équation*

Le classement du caractère régénératif des anémies selon Cowgill (Cowgill *et al.*, 2003) est étudié. Pour chaque valeur donnée par le modèle mathématique, on peut lui attribuer une plage de régénération. Cette plage de régénération est comparée à celle obtenue par le comptage manuel suivant la même démarche. Si les deux plages sont identiques, le classement du caractère régénératif est correct.

La proportion de classement correct des régénérations selon le pourcentage d'agrégés est 0,49 avec un intervalle de confiance à 95% : [0,41 ; 0,57] (Tableau 23).

La proportion d'anémie bien classée est plus élevée lorsque le résultat était inférieur à 0,4 %, tandis que les anémies sont le moins bien classées pour les résultats compris entre 0,4 % et 2,0 % (Tableau 24).

La proportion de classement correct des régénérations selon le pourcentage de ponctués est 0,24 avec un intervalle de confiance à 95% : [0,16 ; 0,32] (Tableau 25).

La proportion d'anémie bien classée est plus élevée lorsque le résultat était inférieur à 20 %, tandis que les anémies sont le moins bien classées pour les résultats compris entre 20 % et 50 % (Tableau 26).

Tableau 23 - Pourcentage de réticulocytes agrégés donné par le modèle mathématique en fonction de celui donné par le comptage manuel

		Comptage manuel				
		0 % - 0,4 %	0,4 % - 2 %	2 % - 4 %	> 4 %	
Par l'équation	0 % - 0,4 %	9	1	3		13
	0,4 % - 2 %	7	6	3	1	17
	2 % - 4 %	1	3	3	1	8
	> 4 %		1	1	3	5
		17	11	10	5	

Tableau 24 - Classification de l'anémie obtenue par le modèle mathématique en fonction du taux de réticulocytes agrégés donné par l'équation

Plage des numérations obtenues par l'équation	Correctement estimé par l'équation	Sous-estimée par l'équation	Sur-estimée par l'équation
0 % - 0,4 %	69 % [63 % ; 75 %]	30 % [24 % ; 37 %]	/
0,4 % - 2,0 %	35 % [25 % ; 47 %]	26 % [13 % ; 34 %]	41 % [29 % ; 54 %]
2,0 - 4,0 %	37 % [26 % ; 49 %]	13 % [4 % ; 21 %]	50 % [38 % ; 62 %]
4,0 % et plus	60 % [38 % ; 82 %]	/	40 % [18 % ; 62 %]

Le modèle estime correctement la régénération de l'anémie si la valeur qu'il donne et la valeur donné par le comptage manuel sont dans la même plage clinique comme définie par Cowgill (Cowgill et al., 2003). Le modèle sur-estime la régénération de l'anémie si la valeur qu'il donne est dans une plage clinique supérieure à la plage clinique obtenue par le comptage manuel. Le modèle sous-estime la régénération de l'anémie si la valeur qu'il donne est dans une plage clinique inférieure à la plage clinique obtenue par le comptage manuel. Les intervalles de confiance à 95% sont entre crochets.

Tableau 25 - Pourcentage de réticulocytes ponctués donné par l'équation en fonction de celui donné par le comptage manuel

		Comptage manuel				
		0% - 10%	10% - 20%	20% - 50%	> 50%	
Par l'équation	0% - 10%	0				0
	10% - 20%	11	8	12		31
	20% - 50%	3	3	1	1	8
	> 50%	2	1	0	1	4
		15	12	13	2	

Tableau 26 - Classification de l'anémie obtenue par l'équation en fonction du taux de réticulocytes ponctués donné par l'équation

Plage des numérations obtenues par l'équation	Correctement estimé par l'équation	Sous-estimée par l'équation	Sur-estimée par l'équation
0 % - 10 %	0	0	/
10 % - 20 %	26 % [17 % ; 34 %]	39 % [29 % ; 48 %]	35 % [26 % ; 44 %]
20 % - 50 %	12 % [0 % ; 24 %]	12 % [14 % ; 24 %]	75 % [59 % ; 91 %]
50 % et plus	25 % [3 % ; 47 %]	/	75 % [53 % ; 97 %]

Le modèle estime correctement la régénération de l'anémie si la valeur qu'il donne et la valeur donné par le comptage manuel sont dans la même plage clinique comme définie par Cowgill (Cowgill et al., 2003). Le modèle sur-estime la régénération de l'anémie si la valeur qu'il donne est dans une plage clinique supérieure à la plage

clinique obtenue par le comptage manuel. Le modèle sous-estime la régénération de l'anémie si la valeur qu'il donne est dans une plage clinique inférieure à la plage clinique obtenue par le comptage manuel. Les intervalles de confiance à 95% sont entre crochets.

b. Individus donnant des résultats rejetés

La proportion d'individus ne respectant pas les conditions de sortie du modèle mathématique est de 14 % [13,76 %, 14,24 %] (paragraphe 2.e.c). Les caractéristiques de ces individus sont étudiées afin d'expliquer pourquoi leur numération par l'automate ne donne pas de résultat valide.

○ *Concernant leurs numérations réticulocytaires par le SYSMEX*

Comme dit précédemment dans la partie Résultats, 7 individus ont été rejetés par le modèle car l'application de l'équation à leurs variables ne respectaient pas la condition suivante :

- %Agrégés + %Ponctués < 100%

Il est observé que les variations positives de %Ponctués sont principalement dues à %HFR, puis secondairement à %LFR. Afin d'identifier des domaines de définitions où le modèle ne donne pas de résultat avec des conditions valides, les variations du modèle en fonction de ces deux variables sont donc étudiées en fixant %MFR à la valeur médiane du Tableau 17 (Figure 28).

Il est observé que les conditions de sortie ne sont pas respectées dans les deux cas de Figure suivants :

- Lorsque %HFR est très bas et que %LFR est très élevé (Figure 28). Biologiquement, cela signifie que le pourcentage de réticulocytes agrégés (%HFR) présente une valeur basse tandis que le pourcentage de réticulocytes ponctués (%LFR) affiche une valeur élevée. Cette situation peut être envisagée si la moelle osseuse cesse de régénérer et libère un important stock de réticulocytes en cours de maturation ;
- Lorsque %LFR est très bas et que %HFR est très élevé (Figure 28). Biologiquement, cela signifie que le pourcentage de réticulocytes ponctués (%LFR) est bas et que le pourcentage de réticulocytes agrégés (%HFR) est élevé. Cependant, d'un point de vue biologique, cette configuration est considérée comme impossible, car elle implique une réticulocytose agrégée sans présence de réticulocytes ponctués. De plus, en se référant aux intervalles de référence

établis pour les chats, il est stipulé que les réticulocytes ponctués (%LFR) représentent 81 % du nombre total de réticulocytes (Granat *et al.*, 2014).

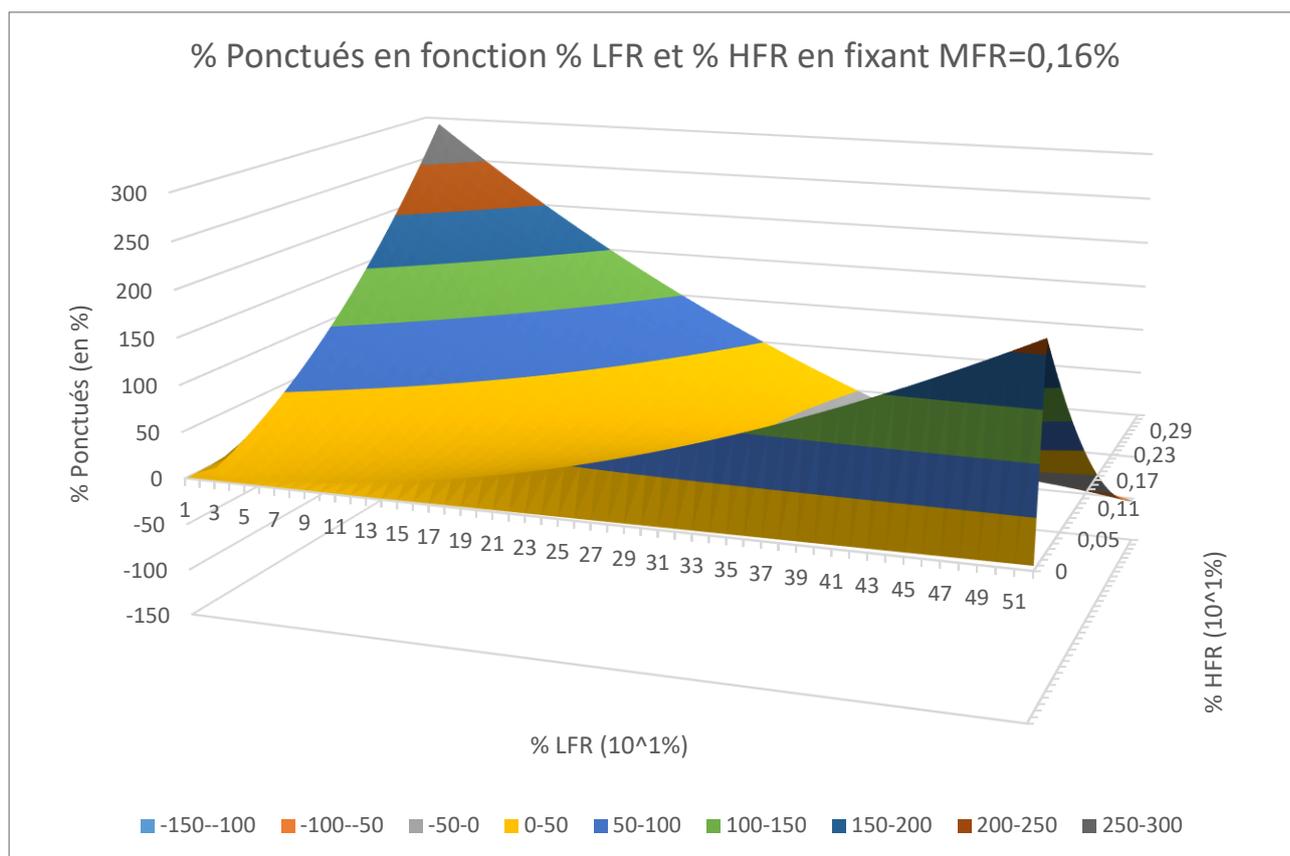


Figure 28 - Taux de ponctués obtenu par l'équation en fonction du taux de LFR et du taux de HFR

Concernant les frottis sanguins :

Les frottis sanguins des 7 individus rejetés sont soumis à une seconde observation, et il est constaté que ces frottis sont de bonne qualité, écartant ainsi la possibilité que la qualité du frottis soit responsable du rejet des résultats par le modèle. De plus, une observation approfondie des frottis confirme la présence d'une proportion significative de réticulocytes agrégés chez ces 7 individus. Rien sur le frottis sanguin des individus ne permet de mettre en évidence des erreurs pré-analytiques dans les échantillons.

c. Bilan

Concernant les réticulocytes agrégés, nous avons réalisé une régression linéaire multiple permettant d'élaborer un modèle où 62% des variations de %Agrégés sont expliquées par les variables HFR, MFR, LFR du SYSMEX XT-2000. La démarche selon l'ASVCP a ensuite été appliquée. Selon les critères de Bland et Altman, la méthode a été validée pour obtenir la numération des réticulocytes agrégés. En revanche, le calcul de la TEO ne permet pas d'utiliser le modèle d'après l'ASVCP.

Concernant les réticulocytes ponctués, nous avons réalisé une régression linéaire multiple permettant d'élaborer un modèle où 35% des variations de %Ponctués sont expliquées par les variables HFR, MFR, LFR du SYSMEX XT-2000. La démarche selon l'ASVCP a ensuite été appliquée. Selon les critères de Bland et Altman, la méthode n'est pas validée pour obtenir la

numération des réticulocytes ponctués. De plus, le calcul de la TEO ne permet pas d'utiliser le modèle d'après l'ASVCP. Les mêmes conclusions peuvent être tirées pour le pourcentage de réticulocytes total.

Un modèle « ajusté » a ensuite été mis en place en retirant la constante de l'équation de %Agrégés. La TEO de %Réticulocytes et %Ponctuées étaient plus faibles mais n'étaient pas inférieures à la TEa. En revanche, on constate que le coefficient de variabilité était plus faible, garantissant une meilleure reproductibilité du modèle.

Les conséquences sur le classement du caractère régénératif ont ensuite été étudiées.

Concernant le pourcentage de réticulocytes agrégés donné par le modèle, nous pouvons avoir confiance dans les résultats affichés pour les faibles et les forts taux de réticulocytes agrégés, car pour ces taux, le classement de la régénération est identique à celui obtenu par comptage manuel respectivement dans 69% et 60% des cas.

Concernant le pourcentage de réticulocytes ponctués, le modèle surestime le classement de la régénération dans 75% des cas lorsqu'il affiche un pourcentage de réticulocytes ponctués supérieur à 20%.

5. Discussion

a. Critères d'inclusion/exclusion

Concernant la composition des sous-groupes, le tirage aléatoire est important pour éviter un biais de sélection. Par ailleurs, utiliser deux sous-groupes pour établir et confirmer le modèle permet de s'affranchir des biais propres aux sous-groupes. Cette approche de validation croisée est importante pour évaluer la robustesse du modèle et sa capacité à généraliser les résultats à de nouvelles observations.

En ce qui concerne notre analyse, il est pertinent de noter que malgré l'utilisation de sous-groupes de taille supérieure à celle recommandée par l'ASVCP (Nabity *et al.*, 2018), comprenant initialement 50 individus, des individus ont été rejetés après que le modèle mathématique ait été appliqué à leur numération obtenue par le SYSMEX XT-2000. Les intervalles de confiance obtenus étaient donc très larges, ce qui remet en question la pertinence de ces analyses (Tableau 14 et 16).

Concernant les individus rejetés par le modèle, leur dossier médical a été étudié. Parmi les 7 individus dont les résultats ont été rejetés par le modèle mathématique, on a observé que 6 d'entre eux présentaient des amas plaquettaires ou des macro-plaquettes, qui sont déjà connus comme étant une source d'erreur potentielle pour les automates (Riley *et al.*, 2001). De plus, 5 individus présentaient des anémies hémolytiques à médiation immune, dont nous ne possédons pas de données dans la littérature pour affirmer qu'elle pourrait avoir un lien avec un numération rejeté par le modèle. Aucune anomalie commune aux 7 individus n'a pu être identifiée.

b. Méthode manuelle et choix du nombre de ponctuations

Il convient de noter qu'il existe une grande disparité dans les différentes études concernant les critères de différenciation entre réticulocytes ponctués et agrégés. Par exemple, Reagan *et al.* (Reagan *et al.*, 1992) considèrent qu'il peut y avoir de 3 à 6 ponctuations sur un réticulocyte ponctué,

tandis que Lilliehöök et Tvedten (Lilliehöök et Tvedten, 2009) mentionnent un nombre allant de 3 à 15 ponctuations pour ce même type de réticulocytes.

Dans notre étude, nous avons arbitrairement choisi de suivre la classification de Lilliehöök et son équipe pour compter les réticulocytes. Cependant, il aurait été plus approprié de consulter plusieurs autres spécialistes afin d'adopter une méthode de comptage des réticulocytes qui soit alignée sur un début de consensus, même s'il n'est pas établi pour le moment. Dans notre étude, les réticulocytes étaient donc considérés comme ponctués lorsqu'ils présentaient de 3 à 15 ponctuations, sans présence d'agrégats. Les réticulocytes étaient considérés comme agrégés à partir de 15 ponctuations ou en présence d'un agrégat.

c. Validité statistique des recommandations de l'ASVCP

Sans la dernière étape de la validation par l'ASVCP, notre modèle mathématique aurait été validé par la méthode de Bland et Altman pour le %Agrégés car les mesures de %Agrégés entre le modèle et le comptage manuel remplissent les deux critères de validité de Bland et Altman et peuvent être considéré comme « concordante ».

Une piste pour expliquer cette TEO importante est la faible reproductibilité du comptage de réticulocytes, même pour la méthode de référence (Tableau 25). En effet, on remarque que concernant le pourcentage de réticulocytes agrégés, le coefficient de variabilité du comptage manuel est d'au moins 10% peu importe le taux de réticulocytes, il ne peut donc pas être considéré comme répétable (Lachin, 2004).

L'utilisation du coefficient de variabilité pour le calcul de la TEO sachant que la mesure des réticulocytes agrégés n'est pas répétable dans la méthode de référence rend difficile la validation selon la démarche de l'ASVCP (Nabity *et al.*, 2018).

En calculant les TEO avec les coefficients de variabilités obtenus, on s'aperçoit que qu'elles seront au minimum de 28,2% pour les réticulocytes agrégés (supérieures à la TEa). La méthode gold standard ne peut donc être considérée pour « répétable ».

Tableau 27 - Coefficient de variabilité en fonction du type de réticulocytes et du taux de réticulocytes par la méthode de comptage manuel

	% Agrégés	% Ponctués	% Réticulocytes
CV taux faible	14,1 %	16,9 %	9,5 %
CV taux moyen	35,6 %	9,7 %	9,2 %
CV taux fort	19,4 %	4,3 %	4,4 %

d. Application du modèle pour le classement des anémies régénératives

Du point de vue d'un clinicien, notre modèle mathématique semble fiable pour fournir des numérations de réticulocytes agrégés. Cependant, il semble également rejeter les individus présentant des anomalies dans les frottis sanguins, ce qui permet aux spécialistes de se concentrer sur l'examen des frottis anormaux sans être encombrés par l'analyse des frottis sans anomalies. En ce qui concerne les numérations de réticulocytes ponctués, du point de vue clinique, les résultats

fournis par le modèle semblent discutables, même si le biais absolu n'est pas significatif selon la méthode de Bland et Altman. Néanmoins, le second taux est peu utilisé par les praticiens, le modèle peut donc être utile en complément de l'automate SYSMEX XT-2000 en routine.

e. Obsolescence du SYSMEX XT-2000

Lors de la réalisation de notre étude, SYSMEX a annoncé que le support du SYSMEX XT-2000 prendrait fin, et qu'il serait remplacé par la gamme SYSMEX XN (Grebert *et al.*, 2021). Cependant, notre étude ne devient pas obsolète pour autant, car elle fournit une démarche à suivre pour la validation des futurs automates en ce qui concerne le taux de réticulocytes, plutôt que de recourir à la méthode de comptage manuel. Ainsi, notre étude propose une base solide pour évaluer la concordance de la gamme SYSMEX XN dans la mesure des réticulocytes avec la méthode de référence.

Conclusion

Malgré les avantages indéniables des automates de comptage en termes de facilité d'utilisation, de gain de temps et de praticité, il est important de noter leurs limitations dans la fourniture de numérations exactes des réticulocytes, comparées à la méthode de numération manuelle. Ainsi, un protocole a été mis en place pour comparer les mesures du SYSMEX XT-2000 avec celles d'un automate déjà validé : l'IDEXX Procyte DX. Ce protocole a notamment pris en compte les recommandations de l'ASVCP, qui permettent d'évaluer les conséquences cliniques d'un biais dans une méthode de mesure. Des outils statistiques, tels que le coefficient de Lin et les graphiques de Bland et Altman, ont également été utilisés pour analyser les résultats.

À partir de 100 échantillons de sang provenant de chats anémiés, l'utilisation des outils statistiques a révélé que l'automate SYSMEX XT-2000 avait tendance à surestimer les numérations de réticulocytes par rapport à l'IDEXX Procyte DX. Plus précisément, toutes les plages de fluorescence étaient surestimées, à l'exception de la plage HFR (High fluorescence reticulocytes). Les recommandations de l'ASVCP ont été appliquées aux mesures du SYSMEX XT-2000, mettant en évidence le fait que ces mesures ne pouvaient pas être utilisées, car leur biais ne permettait pas une classification correcte du caractère régénératif des anémies.

Dans une deuxième phase, un modèle mathématique visant à réduire le biais du SYSMEX XT-2000 a été développé à partir d'un premier sous-groupe de 50 individus à l'aide d'une régression multivariée. Ce modèle a été comparé à la méthode "gold standard" : le comptage manuel, bien que cette dernière soit plus longue à réaliser en comparaison d'une mesure par automate de comptage. Un deuxième sous-groupe de 50 individus a été utilisé pour vérifier l'applicabilité de ce modèle. Les outils statistiques ont montré des coefficients de concordance "acceptables" pour les numérations de réticulocytes agrégés, mais "mauvais" pour les ponctuels. L'application des recommandations de l'ASVCP a montré que le modèle n'était pas utilisable en clinique. De plus, le modèle mathématique présentait des incohérences au niveau des variations du pourcentage de réticulocytes ponctuels. En effet, ce taux variait fortement suite à une variation du taux de HFR, qui correspond théoriquement au taux de réticulocytes agrégés.

Une des principales raisons expliquant l'inapplicabilité du modèle réside dans la mauvaise répétabilité de la méthode "gold standard", pourtant prise en compte dans les calculs de l'ASVCP. Les recommandations de l'ASVCP semblent donc peu adaptées à la mesure des réticulocytes avec de nouvelles méthodes.

Enfin, l'obsolescence de notre étude par rapport au support du SYSMEX XT-2000 a été annoncée pendant que nos expérimentations étaient déjà en cours. Bien que notre étude soit limitée dans ce contexte, l'approche que nous avons utilisée peut être appliquée pour confirmer ou infirmer l'utilisation de nouvelles méthodes de mesure des réticulocytes, telles que la nouvelle gamme d'automates SYSMEX XN.

Liste des références bibliographiques

- ADDINSOFT (2023) Régression linéaire multiple dans Excel. In *XLSTAT*. [<https://help.xlstat.com/fr/6685-multiple-linear-regression-excel-tutorial>] (consulté le 29/06/2023).
- ARNOLD, J.E., CAMUS, M.S., FREEMAN, K.P., *et al.* (2019) ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0). *Veterinary Clinical Pathology* vol. 48, n° 4, p. 542-618. [<https://doi.org/10.1111/vcp.12810>]
- BAUDU, C. (2020) Numération réticulocytaire féline. Comparaison de la méthode manuelle avec le Procyte DXTM (IDEXX): étude de 153 cas. Thèse de médecine vétérinaire. École nationale vétérinaire de Nantes.
- BAUER, N., NAKAGAWA, J., DUNKER, C., *et al.* (2011) Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV™ compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses: Part I--precision, linearity, and accuracy of complete blood cell count. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 23, n° 6, p. 1168-1180. [<https://doi.org/10.1177/1040638711425572>]
- BLAND, J.M., ALTMAN, D.G. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* vol. 1, n° 8476, p. 307-310.
- CHESON, B.D., ROM, W.N., WEBBER, R.C. (1984) Basophilic stippling of red blood cells: A nonspecific finding of multiple etiology. *American Journal of Industrial Medicine* vol. 5, n° 4, p. 327-334. [<https://doi.org/10.1002/ajim.4700050409>]
- COOK, R.D. (1977) Detection of Influential Observation in Linear Regression. *Technometrics* vol. 19, n° 1, p. 15-18. [<https://doi.org/10.2307/1268249>]
- CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE (2023) Inclusions – eClinpath. In *College of Veterinary Medicine*. [<https://eclinpath.com/hematology/morphologic-features/red-blood-cells/rbc-inclusions/>] (consulté le 04/10/2022).
- CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE (2023) Mycoplasma – eClinpath. In *College of Veterinary Medicine*. [<https://eclinpath.com/hematology/infectious-agents/mycoplasma/>] (consulté le 04/10/2022).
- COWGILL, E.S., NEEL, J.A., GRINDEM, C.B. (2003) Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* vol. 33, n° 6, p. 1223-1244. [[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00099-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00099-8)]
- DE VOS, K. (2023) Cell Counter. In *Image J*. [<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>] (consulté le 28/06/2023).
- DELLA VEDOVA (2021) Introduction à la régression linéaire multiple - DellaData. In *DellaData*. [<https://delladata.fr/regression-lineaire-multiple/>] (consulté le 08/05/2023).
- DESQUILBET, L. (2012) Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance. Polycopié. Maisons-Alfort, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques.
- EVANS, R., GRUFFYDD-JONES, T. (1984) Anaemia in cats. *In Practice* vol. 6, n° 6, p. 168-177. [<https://doi.org/10.1136/inpract.6.6.168>]
- FUJINO, Y., NAKAMURA, Y., MATSUMOTO, H., *et al.* (2013) Development and Evaluation of a Novel In-Clinic Automated Hematology Analyzer, ProCyte Dx, for Canine Erythrocyte Indices, Leukogram, Platelet Counts and Reticulocyte Counts. *Journal of Veterinary Medical Science* vol. 75, n° 11, p. 1519-1524. [<https://doi.org/10.1292/jvms.13-0264>]
- GIRI, D. (2018) Reticulocyte Count: Principle, Procedure, Calculations and Clinical Significances. *LaboratoryTests.org*. [<https://laboratorytests.org/reticulocyte-count/>] (consulté le 02/03/2022).
- GRANAT, F., GEFFRÉ, A., BOURGÈS-ABELLA, N., *et al.* (2014) Feline reference intervals for the Sysmex XT-2000iV and the ProCyte DX haematology analysers in EDTA and CTAD blood specimens. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 16, n° 6, p. 473-482. [<https://doi.org/10.1177/1098612X13511811>]

- GREBERT, M., GRANAT, F., BRAUN, J., *et al.* (2021) Validation of the Sysmex XN-V hematology analyzer for canine specimens. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 50, n° 2, p. 184-197. [https://doi.org/10.1111/vcp.12936]
- HATHAWAY, J.E. (1976) Feline anemia. *The Veterinary Clinics of North America* vol. 6, n° 3, p. 495-510. [https://doi.org/10.1016/s0091-0279(76)50066-9]
- HERMAN, T.F., JAVAID, M.U. (2022) Heinz Body. In *StatPearls*. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551622/] (consulté le 04/10/2022).
- IDEXX (2023) Analyseur d'hématologie IDEXX ProCyte Dx. In *IDEXX France*. [https://www.idexx.fr/fr/veterinary/analyzers/hematology/procyte-dx-analyzer/#form] (consulté le 02/03/2022).
- IDEXX LABORATORIES (2021) ProCyte Dx: Manuel d'utilisation. In *ProCyte Dx | Analyseur d'hématologie | Manuel d'utilisation*. [https://www.idexx.ch/files/procyte-dx-operators-guide-fr-fr.pdf] (consulté le 05/04/2022).
- IMAGEJ (2023) ImageJ. In *ImageJ*. [https://imagej.nih.gov/ij/index.html] (consulté le 28/06/2023).
- INGRAM, M., COOPERSMITH, A. (1969) Reticulated Platelets following Acute Blood Loss. *British Journal of Haematology* vol. 17, n° 3, p. 225-229. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1969.tb01366.x]
- IVORY, K., SARRIA, B., FAIRWEATHER-TAIT, S.J., *et al.* (2007) Reticulated platelets interfere with flow cytometric reticulocyte counts. *International Journal of Laboratory Hematology* vol. 29, n° 5, p. 352-360. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00881.x]
- LACHIN, J.M. (2004) The role of measurement reliability in clinical trials. *Clinical Trials* vol. 1, n° 6, p. 553-566. [https://doi.org/10.1191/1740774504cn057oa]
- LANDIS, J.R., KOCH, G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* vol. 33, n° 1, p. 159-174.
- LANGFORD, K., LUCHTMAN-JONES, L., MILLER, R., *et al.* (2003) Performance evaluation of the Sysmex XT-2000i automated hematology analyzer. *Laboratory Hematology* vol. 9, n° 1, p. 29-37.
- LILLIEHÖÖK, I., TVEDTEN, H. (2009) Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 38, n° 2, p. 163-174. [https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00125.x]
- LIN, L.I.-K. (1989) A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility. *Biometrics* vol. 45, n° 1, p. 255-268. [https://doi.org/10.2307/2532051]
- XLSTAT 2022.1. (2023) [Logiciel], LUVIMERO.
- MAYOL, J.-F., LAPLACE-BUILHE, C., MULLER, C.D. (2020) *La cytométrie en flux*, 2e éd. Paris, Lavoisier-Tec & doc.
- MEL, H.C., PRENANT, M., MOHANDAS, N. (1977) Reticulocyte Motility and Form: Studies on Maturation and Classification. *Blood* vol. 49, n° 6, p. 1001-1009. [https://doi.org/10.1182/blood.V49.6.1001.1001]
- NABITY, M.B., HARR, K.E., CAMUS, M.S., *et al.* (2018) ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 47, n° 1, p. 9-21. [https://doi.org/10.1111/vcp.12583]
- NCCLS (2004) Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline—Second Edition. *NCCLS document H44-A2* n° 8, p. 39.
- OLVER, C.S. (2022) Erythropoiesis. In *Schalm's Veterinary Hematology*, 7^e ed. Hoboken, John Wiley & Sons. p. 149-157. [https://doi.org/10.1002/9781119500537.ch19]
- PEEBLES, D.A., HOCHBERG, A., CLARKE, T.D. (1981) Analysis of manual reticulocyte counting. *American Journal of Clinical Pathology* vol. 76, n° 5, p. 713-717. [https://doi.org/10.1093/ajcp/76.5.713]
- PINTO DA CUNHA, N., GIORDANO, A., CANIATTI, M., *et al.* (2009) Analytical validation of the Sysmex XT-2000iV for cell counts in canine and feline effusions and concordance with cytologic diagnosis. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 38, n° 2, p. 230-241. [https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00107.x]
- REAGAN, W.J., VAP, L.M., WEISER, M.G. (1992) Flow cytometric analysis of feline reticulocytes. *Veterinary Pathology* vol. 29, n° 6, p. 503-508. [https://doi.org/10.1177/030098589202900603]
- RILEY, R.S., BEN-EZRA, J.M., GOEL, R., *et al.* (2001) Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* vol. 15, n° 5, p. 267-294. [https://doi.org/10.1002/jcla.1039]

- SCHIMENTI, K.J., LACERNA, K., WAMBLE, A., *et al.* (1992) Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. *Cytometry* vol. 13, n° 8, p. 853-862. [<https://doi.org/10.1002/cyto.990130808>]
- SPADA, E., ANTOGNONI, M.T., PROVERBIO, D., *et al.* (2015) Haematological and biochemical reference intervals in adult Maine Coon cat blood donors. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 17, n° 12, p. 1020-1027. [<https://doi.org/10.1177/1098612X14567549>]
- STEINBERG, J.D., OLVER, C.S. (2005) Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* vol. 34, n° 1, p. 23-27. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00004.x>]
- SYSMEX EUROPE SE (2021) XT-2000i. In *Sysmex*. [<https://www.sysmex.se/products/product-singleview/xt-2000i-538.html>] (consulté le 31/01/2021).
- TVEDTEN, H. (2022) Classification and Laboratory Evaluation of Anemia. In *Schalm's Veterinary Hematology*, 7^e ed. Hoboken, John Wiley & Sons. p. 198-208. [<https://doi.org/10.1002/9781119500537.ch25>]
- WEISS, D.J. (2022) Congenital Dyserythropoiesis. In *Schalm's Veterinary Hematology*, 7^e ed. Hoboken, John Wiley & Sons. p. 248-251. [<https://doi.org/10.1002/9781119500537.ch31>]
- WEISSENBACHER, S. (2009) Evaluation of the Sysmex XT-2000iV hematology instrument for use with feline blood. Thèse de doctorat. University of Zurich. [<https://doi.org/10.5167/UZH-32230>]
- WINZELBERG OLSON, S., HOHENHAUS, A.E. (2019) Feline non-regenerative anemia: Diagnostic and treatment recommendations. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 21, n° 7, p. 615-631. [<https://doi.org/10.1177/1098612X19856178>]
- YERGEAU, E., POIRIER, M. (2023) Régression multiple. In *SPSS à l'UdeS*. [<https://spss.espaceweb.usherbrooke.ca/regression-multiple/>] (consulté le 29/06/2023).
- ZEISS GROUP INTERNATIONAL (2023) ZEISS Allemagne, technologie optique et opto-électronique. In *Zeiss*. [<https://www.zeiss.fr/corporate/home.html>] (consulté le 01/07/2023).
-

Annexe 1 : Description de l'échantillon et des sous-groupes

- *Description épidémiologique : Sexe des individus de l'échantillon (n=100)*

Le diagramme circulaire 38 ci-dessous représente la répartition des sexes au sein de l'échantillon étudié :

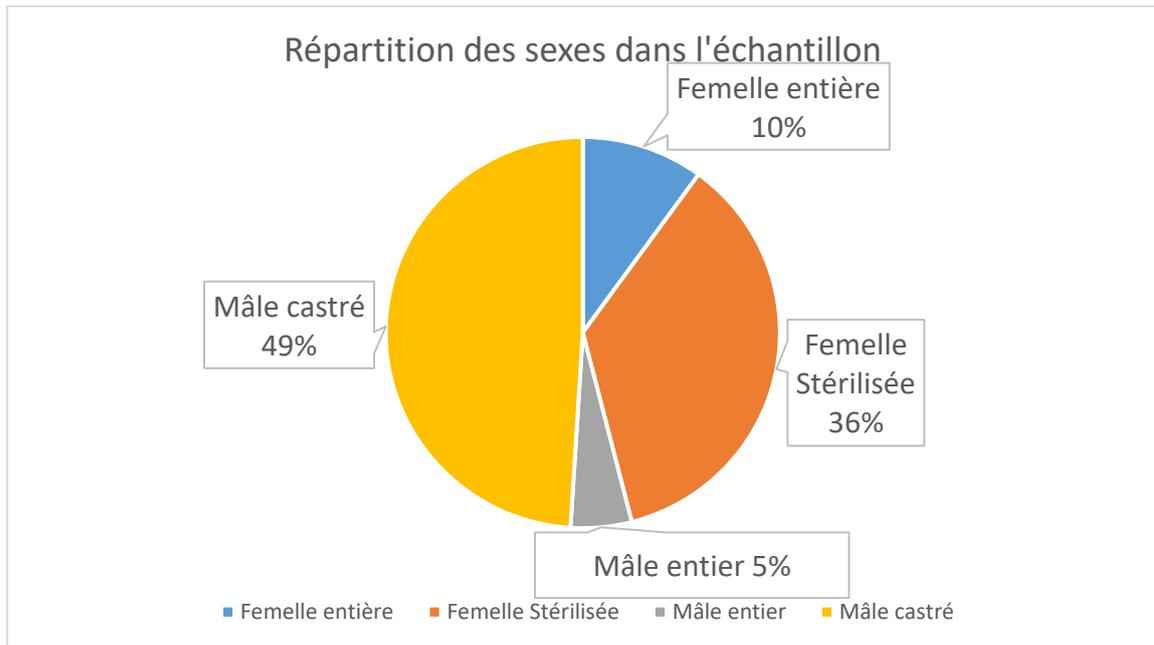


Figure 29 - Diagramme circulaire montrant la répartition des sexes au sein de l'échantillon (n=100)

- *Description épidémiologique : Âge des individus de l'échantillon (n=100)*

La répartition de l'âge au sein de l'échantillon est présentée sur la Figure 39 :

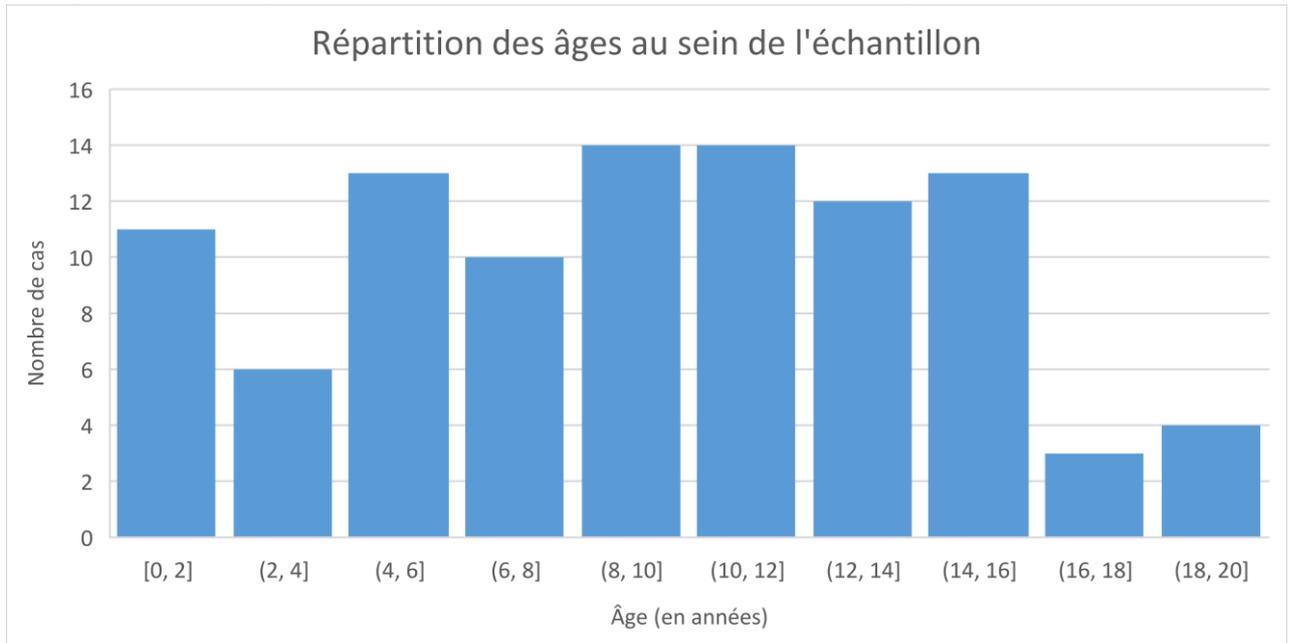


Figure 30 - Histogramme montrant la répartition des âges au sein de l'échantillon (n=100)

- *Description épidémiologique : répartition des races dans l'échantillon (n=100)*

La Figure 40 donne la répartition des races au sein de l'échantillon :

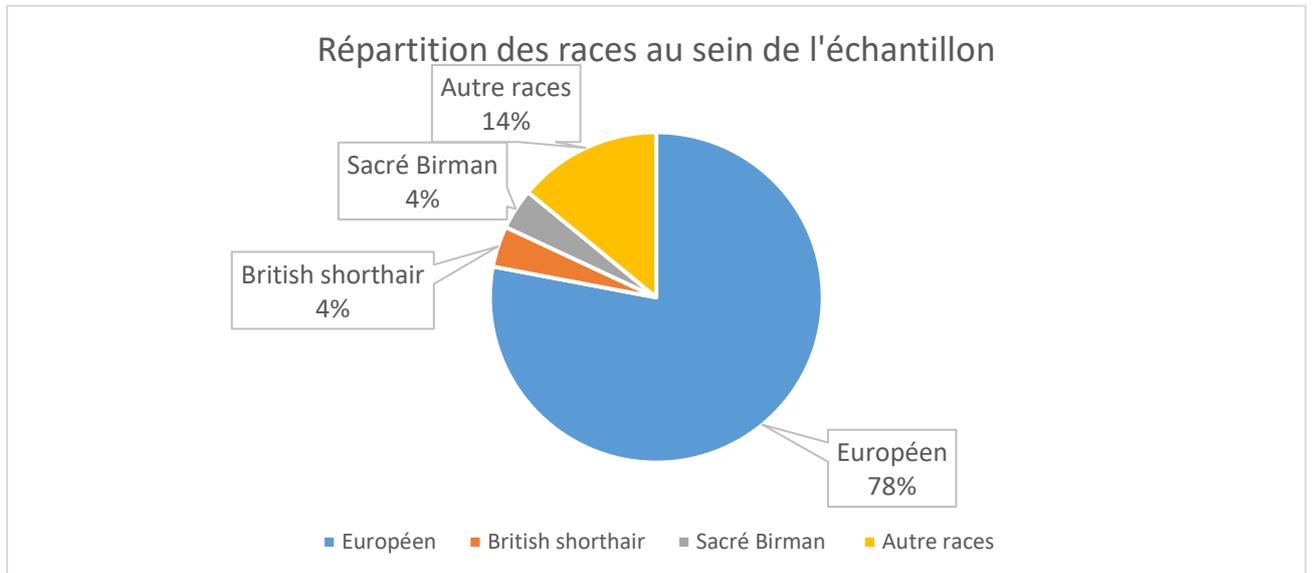


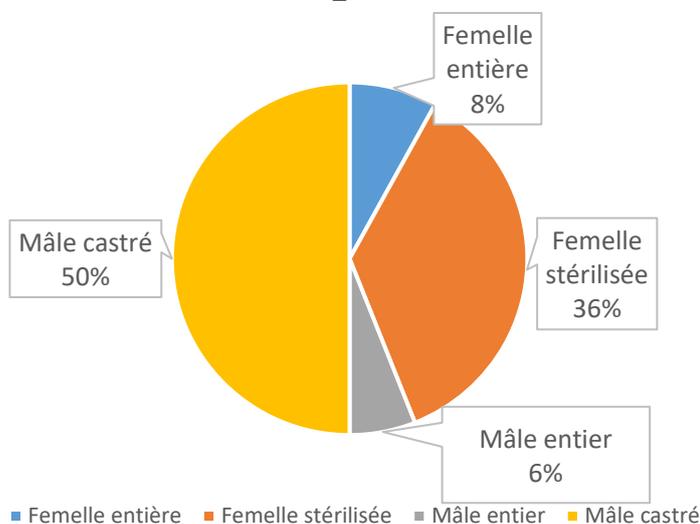
Figure 31 - Diagramme circulaire montrant la répartition des races au sein de l'échantillon (n=100)

- *Description épidémiologique : Sexes des sous-groupes (n=50)*

Le diagramme circulaire 41 représente la répartition des sexes au sein du sous-groupe 1. Le diagramme circulaire 42 représente la répartition des sexes au sein du sous-groupe 2.

Répartition des sexes dans le sous-groupe 1

1



Répartition des sexes dans le sous-groupe 2

2

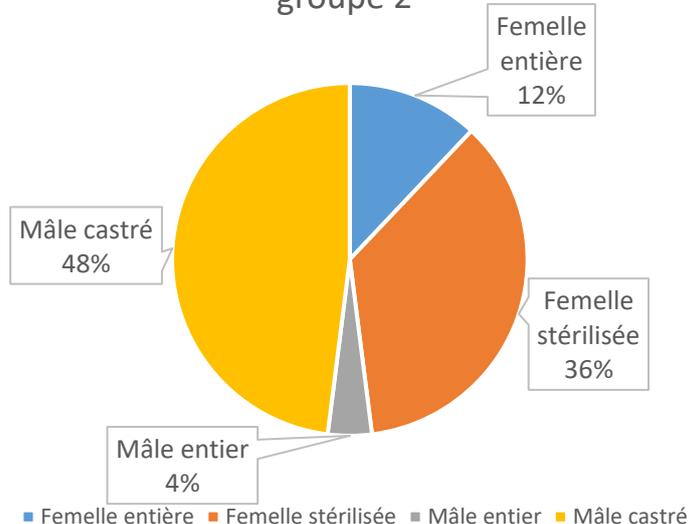


Figure 32 - Diagramme circulaire montrant la répartition des sexes au sein du sous-groupe 1 (n=50)

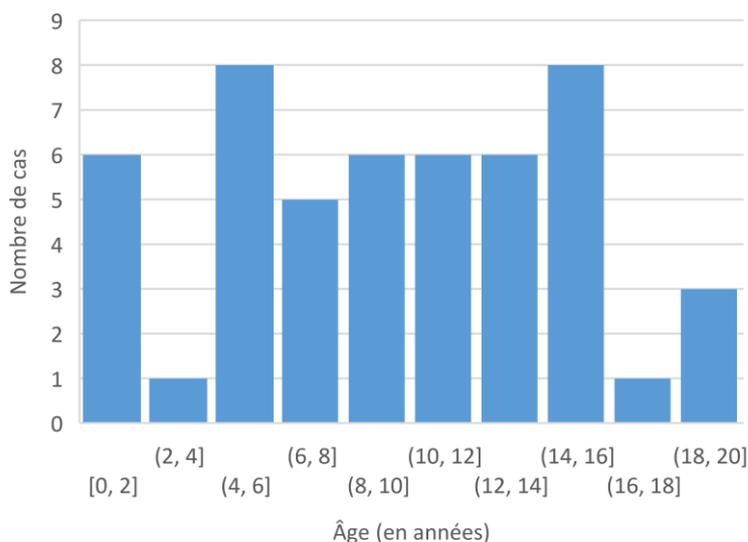
Figure 33 - Diagramme circulaire montrant la répartition des sexes dans le sous-groupe 2 (n=50)

- *Description épidémiologique : Âge des individus des sous-groupe (n=50)*

La répartition de l'âge du sous-groupe 1 est présentée sur la Figure 43. La répartition de l'âge du sous-groupe 2 est présentée sur la Figure 44.

Répartition des âges au sein du sous-groupe 1

1



Répartition des âges au sein du sous-groupe 2

2

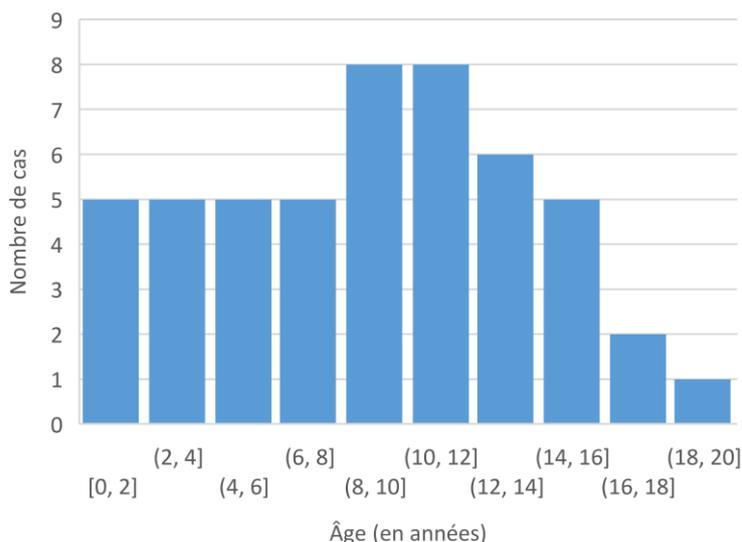


Figure 34 - Histogramme montrant la répartition de l'âge au sein du sous-groupe 1 (n=50)

Figure 35 - Histogramme montrant la répartition de l'âge au sein du sous-groupe 2 (n=50)

- *Description épidémiologique : répartition des races dans les sous-groupes (n=50)*

La Figure 45 montre la répartition des races dans le sous-groupe 1. La Figure 46 montre la répartition des races dans le sous-groupe 2 :

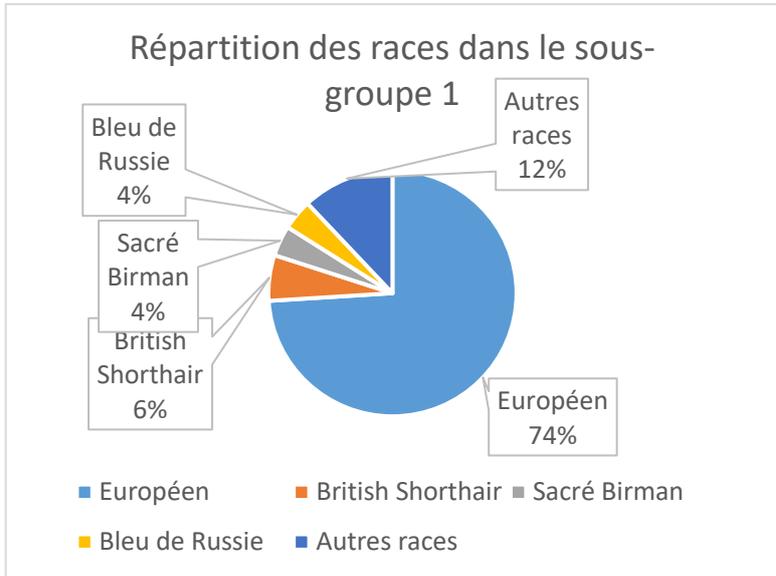


Figure 36 - Diagramme circulaire montrant la répartition des races dans le sous-groupe 1 (n=50)

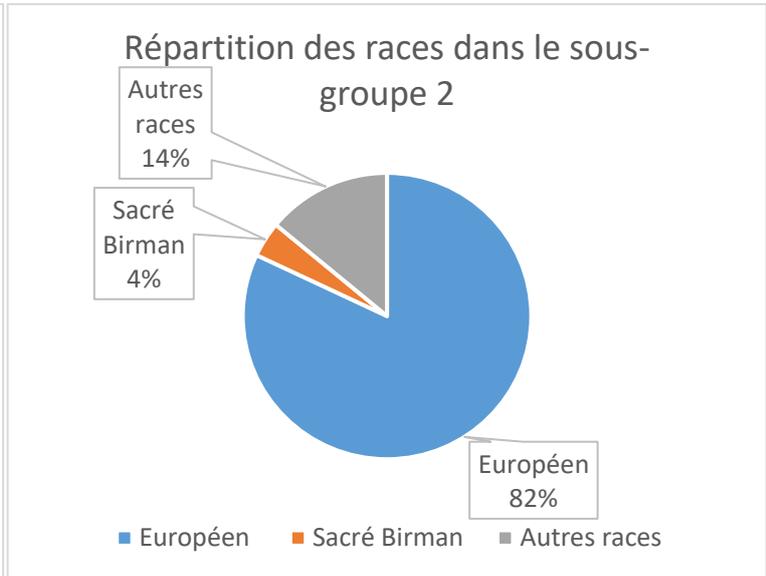


Figure 37 - Diagramme circulaire montrant la répartition des races dans le sous-groupe 2 (n=50)

Annexe 2 : Explication d'un modèle multivaré, d'après (Yergeau et Poirier, 2023)

« Le modèle multivaré »

De manière générale, les modèles statistiques se présentent globalement ainsi :

$$\text{Observation}_i : (\text{Modèle}_i) + \text{erreur}_i$$

Chaque valeur de la variable dépendante (Observation_i) peut être expliquée en partie par un modèle statistique. La partie que le modèle ne peut expliquer est l'erreur spécifique associée à cette valeur.

Dans le cas de la régression linéaire simple, ce modèle général peut se décliner plus précisément ainsi :

$$Y_i : (b_0 + b_1X_1) + \varepsilon_i$$

Où Y représente les valeurs possibles de la variable dépendante qui peuvent être expliquées par le modèle général de régression. Encore une fois, la portion qui ne peut être expliquée par le modèle est symbolisée par ε_i qui représente l'erreur commise par le modèle pour chaque valeur de Y .

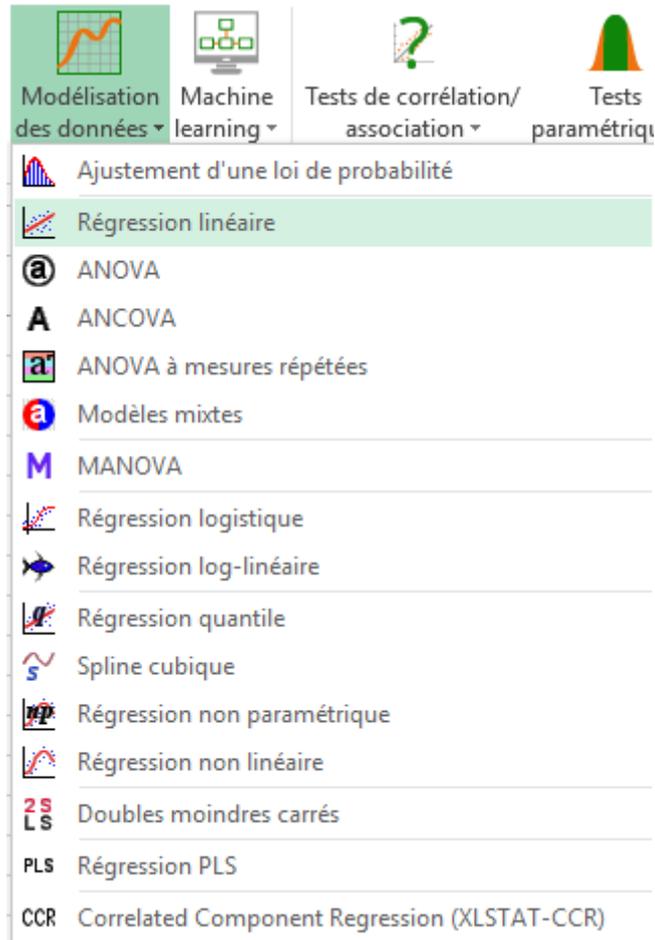
L'équation de la régression linéaire multiple est en fait la généralisation du modèle de régression simple.

$$Y_i : (b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n) + \varepsilon_i$$

On observe que chaque variable indépendante (X) est multipliée par son propre coefficient bêta (b) qui sous sa forme standardisée correspond à sa contribution relative dans le modèle. La constante (b_0) correspond à la valeur de la variable dépendante lorsque toutes les variables indépendantes égalent 0. On appelle aussi b_0 l'ordonnée à l'origine. Associée de près à l'évaluation du modèle, l'indice de corrélation multiple R^2 représente le pourcentage de variance expliquée par le modèle (la combinaison des variables indépendantes). »

Annexe 3 : Utilisation de XLSTAT, d'après (ADDINSOFT, 2023)

« Une fois XLSTAT lancé, choisissez la commande **XLSTAT / Modélisation / Régression linéaire**.



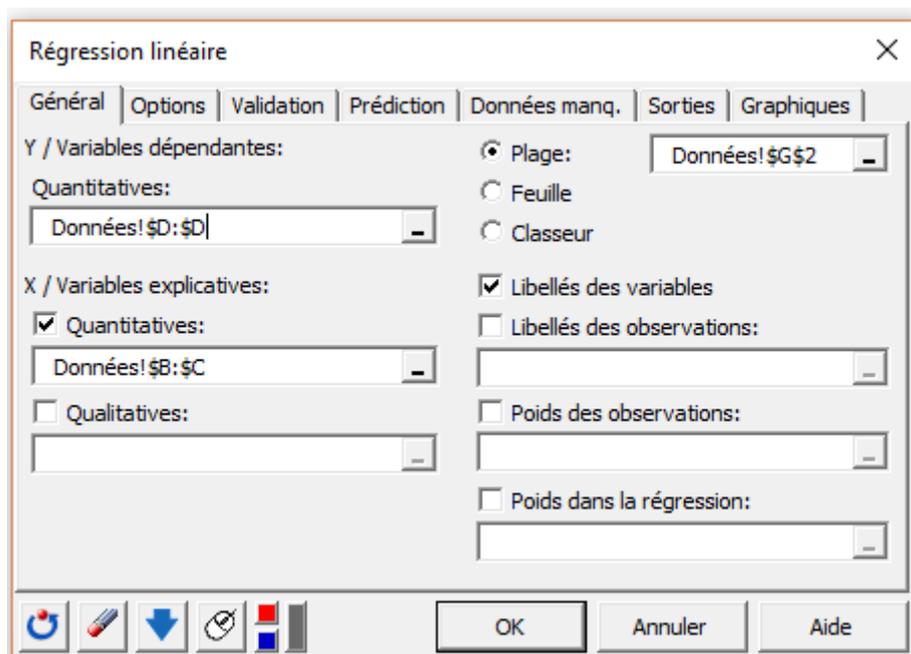
Une fois le bouton cliqué, la boîte de dialogue correspondant à la régression apparaît.

Dans l'onglet **Général**, vous pouvez alors sélectionner les données sur la feuille Excel.

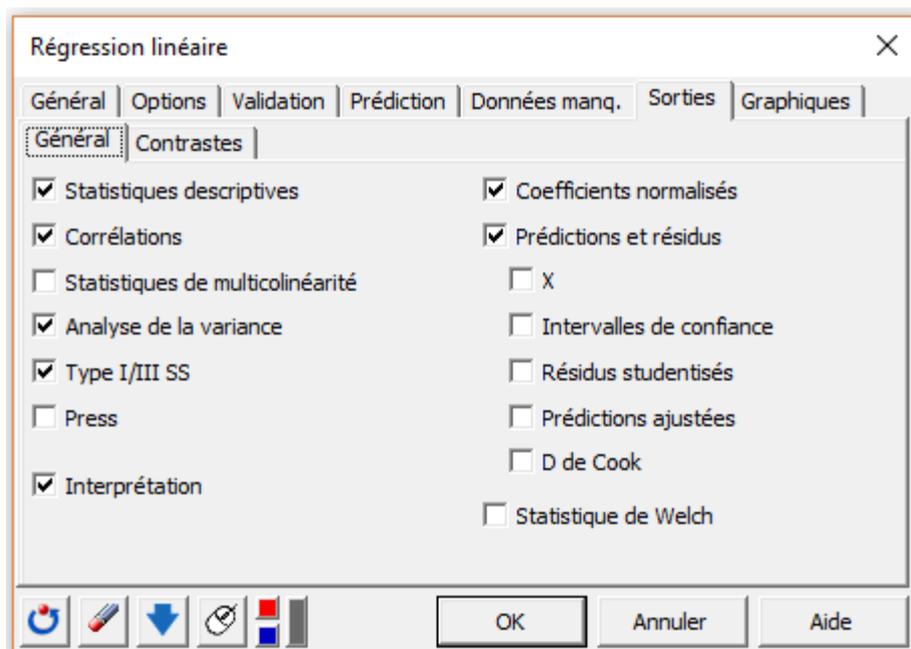
La **Variable dépendante** correspond à la variable expliquée (ou variable à modéliser), qui est dans ce cas précis le "poids".

Les **variables quantitatives explicatives** sont ici la "taille" et l'"âge". On veut ici expliquer la variabilité du poids par celle de la taille et de l'âge.

L'option **Libellés des variables** est laissée activée car la première ligne des colonnes comprend le nom des variables.



Dans l'onglet **Sorties**, nous laissons l'option **Prédictions et résidus** sélectionnée car nous analyserons les prédictions et les résidus pour valider l'hypothèse de normalité de la régression, et pour identifier des valeurs extrêmes.



Une fois que vous avez cliqué sur le bouton **OK**, les calculs commencent puis les résultats sont affichés.

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE MATHÉMATIQUE POUR LA DÉTERMINATION DE LA NUMÉRATION RÉTICULOCYTAIRE CHEZ LE CHAT ANÉMIÉ PAR L'AUTOMATE D'HÉMATOLOGIE SYSMEX XT-2000

AUTEUR : Barnabé COURZEREUX

RÉSUMÉ :

En médecine vétérinaire, la numération réticulocytaire est utilisée pour classer le caractère régénératif des anémies. On distingue 2 populations de réticulocytes chez le chat : les réticulocytes agrégés et les réticulocytes ponctués. Ces deux populations se distinguent facilement en utilisant la méthode de référence : le comptage manuel. Cependant, cette méthode est plus fastidieuse à réaliser qu'une mesure par un automate de comptage d'hématologie. Ces derniers sont couramment utilisés en clinique généraliste. Il est donc important de vérifier l'application clinique de ces derniers. Un des plus répandus est le SYSMEX XT-2000 et ce dernier présente des biais dans la mesure des réticulocytes.

Dans un premier temps, ce biais a été quantifié à l'aide d'un échantillon de 100 individus en comparant les mesures de cet automate à un automate de référence : l'IDEXX Procyte DX. Pour cela, des outils statistiques et les recommandations de l'ASVCP ont été utilisés. Il a été montré que le SYSMEX XT-2000 surestimait les numérations réticulocytaires d'après les recommandations ASVCP.

Ensuite, un premier sous-groupe de 50 individus a été utilisé pour établir un modèle mathématique permettant la correction du biais mis en évidence. La méthode de référence : le comptage manuel a été comparée aux mesures du SYSMEX XT-2000. La méthode « pas-à-pas » couplée à une régression linéaire multivariée ont été appliquées. L'applicabilité de ce modèle mathématique a été mesurée à l'aide des mêmes outils statistiques que précédemment et les recommandations ASVCP, sur un deuxième sous-groupe de 50 individus.

En suivant les outils statistiques et les recommandations ASVCP, le modèle mathématique n'est pas applicable pour l'obtention des numérations réticulocytaires.

MOTS CLÉS :

NUMÉRATION RÉTICULOCYTAIRE, SYSMEX XT-2000, CHAT ANÉMIÉ, MODÈLE MATHÉMATIQUE, HÉMATOLOGIE, MÉDECINE VÉTÉRINAIRE

JURY :

Président : Pr Loïc Desquilbet

Directeur de thèse : Dr Pierre Deshuillers

Examinatrice : Pr Christelle Maurey-Guéneac

Invitée : Pr Amélie Fau

DEVELOPMENT OF A MATHEMATICAL MODEL FOR DETERMINING RETICULOCYTE COUNT IN ANEMIC CATS USING THE SYSMEX XT-2000 AUTOMATED HEMATOLOGY SYSTEM

AUTHOR: Barnabé COURZEREAX

SUMMARY:

In veterinary medicine, reticulocyte counts are used to classify the regenerative nature of anemias. There are two populations of reticulocytes in cats: aggregated reticulocytes and punctate reticulocytes. These two populations are easily distinguished using the reference method: manual counting. However, this method is more labor-intensive compared to reticulocyte counting using an automated hematology analyzer. The latter are commonly used in general practice. It is therefore important to verify their clinical application. One of the most widely used is the SYSMEX XT-2000, which has a bias in reticulocyte measurement.

Initially, this bias was quantified using a sample of 100 individuals by comparing the measurements from the SYSMEX XT-2000 with those from a reference analyzer, the IDEXX Procyte DX. Statistical tools and ASVCP recommendations were used for the comparison. It was demonstrated that the SYSMEX XT-2000 overestimated reticulocyte counts based on the ASVCP recommendations.

An initial subgroup of 50 individuals was then used to establish a mathematical model for correcting the bias identified. The reference method, manual counting, was compared with the SYSMEX XT-2000 measurements. The "step-by-step" method coupled with multivariate linear regression was applied. The applicability of this mathematical model was measured using the same statistical tools and ASVCP recommendations, on a second sub-group of 50 individuals.

Following the statistical tools and the ASVCP recommendations, the mathematical model is not applicable for obtaining reticulocyte counts.

KEYWORDS:

RETICULOCYTE COUNT, SYSMEX XT-2000, ANEMIC CAT, MATHEMATICAL MODEL, HEMATOLOGY, VETERINARY MEDICINE

JURY:

Chairperson: Pr Loïc Desquilbet

Thesis Director: Dr Pierre Deshuillers

Reviewer: Pr Christelle Maurey-Guénec

Guest: Pr Amélie Fau